

미세먼지 PM10에 노출된 RAW264.7 세포에 대한 해당화 추출물의 항염증 활성

안민아 · 현태경

Anti-inflammatory effects of *Rosa rugosa* extracts in RAW264.7 cells exposed to particulate matter (PM10)

Min-A Ahn · Tae Kyung Hyun

Received: 7 June 2022 / Revised: 26 June 2022 / Accepted: 26 June 2022
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Airborne fine dust (FD) particles smaller than 10 μm in diameter (PM10) are one of the major causes of air pollution in East Asia, including Korea, and have become a major contributor to respiratory and skin problems. FD inordinately promotes the production of reactive oxygen species and inflammatory response in macrophages, leading to cell damage and death. *Rosa rugosa*, a deciduous shrub of the *Rosa* genus, has been used in traditional East Asian herbal medicine to treat various illnesses. The present study investigated the anti-inflammatory effects of *R. rugosa* organ extracts on PM10-stimulated RAW264.7 macrophages. Compared to non-treated RAW264.7 cells, treatment with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PM10 resulted in increased nitric oxide (NO) production, similar to lipopolysaccharide treatment. Additionally, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stem extract reduced NO production by more than 45% compared to mock treatment. Furthermore, PM10-induced expression of interleukin (IL)-1 β , IL-6, inducible NO synthase, and cyclooxygenase-2 was significantly reduced by stem extract treatment, indicating that the anti-inflammatory effect of the stem extract is mediated by the inhibition of pro-inflammatory mediators in PM10-stimulated RAW 264.7 cells. These results indicate that the *R. rugosa* stem could be considered a natural remedy with a protective effect against inflammatory responses induced by harmful airborne dust.

Keywords airborne fine dust, inflammatory response, pro-inflammatory mediators, *Rosa rugosa*

서론

급격한 산업화의 발전과 석유 자동차 사용의 증가 등 인위적인 활동으로 유발된 대기 오염으로 인해 최근 한국을 포함한 동아시아 지역에서 미세먼지(fine dust, FD) 입자로 인한 대기오염이 원인이 되는 피해가 증가하고 있다(Fernando et al. 2017). 특히 대기 중에 존재하는 10 μm 미만의 미세먼지(particulate matter 10, PM10)는 크기가 너무 작아 기관지 섬모에서 걸리지 않고 폐포로까지 깊숙이 침투하여 염증, 천식, 만성 기관지염 등의 질병을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Lee et al. 2018). 또한 PM10에 만성적으로 노출되면 대식세포의 pro-inflammatory cytokine의 과발현 유도를 통한 염증반응 유발 및 활성산소 종(ROS)의 과다 생성을 통한 세포 손상과 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(Fernando et al. 2017; Park et al. 2016). 뿐만 아니라 미세먼지는 후각상피 세포를 통하여 직접적으로 뇌 내피세포로 전달되어 중추신경계의 염증 반응 유발 및 알츠하이머 질병과 같은 인지 기능 장애를 유발시키는 주요 원인으로 보고되어 있다(Calderón-Garcidueñas et al. 2012). 이처럼 PM10에 의한 건강문제가 사회문제로 주목받고 대중의 관심이 증가함에 따라 미세먼지로 유도될 수 있는 산화적 스트레스와 염증반응을 예방 및 개선시킬 수 있는 천연 소재 개발에 관한 연구가 필요한 실정이다.

해당화(*Rosa rugosa*)는 동아시아의 온대지역부터 아한대 지역까지 넓게 자생하는 장미과 장미속의 낙엽관목으로, 예부터 한국을 포함한 동아시아 지역에서 위통, 당뇨, 설사 등의 민간요법 치료제로 이용되어 왔다(Kwak et al. 2019; Park

M.-A. Ahn · T. K. Hyun (✉)
충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과
(Department of Industrial Plant Science and Technology, College of Agricultural, Life and Environmental Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)
e-mail: taekyung7708@chungbuk.ac.kr

2008). 해당화에는 풍부한 비타민C와 terpenoids, quercetin, isoquercetin, rutin 등의 플라보노이드, tellimagrandin I, II, rugosin과 같은 가수분해형 탄닌 등이 주성분으로 보고되어 있으며, 이를 기반으로 해당화의 부위별 추출물을 이용한 진경작용, 항알레르기작용, 항고지혈증, 피부노화예방, 미백효과, 당뇨치료 등의 연구가 보고되었고(Jung et al. 2005; Kang and Sohn 2010; Kim et al. 2018; Kwak et al. 2019; Park 2008), 특히 해당화 에탄올 추출물의 경우 LPS (lipopolysaccharide, 지질다당류)로 자극된 RAW264.7 대식세포에서 MEK/ERK 신호 경로의 불활성화를 유도함으로써 pro-inflammatory cytokine의 과발현을 억제하는 것으로 알려져 있다(Kim et al. 2022). 이상의 연구 결과는 미세먼지 유도 염증 예방 및 개선을 위한 천연소재로써 해당화 추출물의 이용 가능성을 시사한다.

따라서 본 연구에서는 RAW264.7 대식세포에 대한 PM10 입자의 영향을 조사하고, 항염증 활성이 탁월하다고 알려진 해당화 추출물을 대상으로 PM10유도 염증 개선 효과를 확인하고자 하였으며, 이를 통하여 PM10으로 유도된 대식세포의 염증반응에 대한 기능성 소재로 해당화를 활용할 수 있음을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용한 대기 미립자 물질(PM10, ERM-CZ100)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Fernando et al. (2017)에서 설명된 대로 미세먼지 입자를 배지에 현탁시켰다. 본 실험에서 사용한 해당화는 충북대학교 포장에서 수확 후 사용하였다. 시료는 잎, 줄기, 꽃 그리고 열매로 나누어 수확하였으며, 동결 건조 후 분쇄된 시료에 ethanol (1:10)을 첨가하여 24시간 동안 2회 추출하였고, 여과지를 이용하여 여과 하였다. 여과한 추출물은 감압농축기를

사용하여 농축하였으며, 이 시료는 -70°C에 보관하여 사용하였다.

Nitric oxide(NO) 생성 억제 활성 측정 및 세포생존을 측정

대식세포에서 미세먼지 PM10으로 유도된 염증반응에 대한 해당화 추출물의 항염증 효과를 조사하고, 대식세포에 대한 PM10과 해당화의 세포독성을 측정하기 위해 RAW264.7 대식세포(ATCC® TIB-71TM, ATCC, Rockville, MD, USA)에 PM10 (100 µg/ml)과 각 추출물(100 µg/ml)을 동시에 처리 하였다. CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양한 후 배양액 100 µl와 Griess시약(Griess Reagent System, Promega, WI, USA)을 혼합하여 흡광도 540 nm에서 NO 생성량을 측정 하였다.

세포 생존율은 MTT 분석법을 이용하여 분석하였으며 (Yoo et al. 2021), 각 well에 형성된 formazan blue를 DMSO로 용해시킨 후 550 nm 파장에서 흡광도(iMARK™ microplate reader, Bio-RAD, CA, USA)를 측정하였다.

Real-time PCR을 통한 유전자 발현 분석

RAW264.7 대식세포에 PM10 (100 µg/ml)과 해당화 줄기 추출물(100 µg/ml)을 처리하여 24시간 동안 재 배양한 후 PBS로 세포를 세척하였다. Total RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출하였으며, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO Co., Ltd, Osaka, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. CFX96™ Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 각 유전자의 발현 패턴을 분석하였다. 각 유전자(*iNOS*, *COX-2*, *IL-1β*, *IL-6*)의 전사 수준은 내부 대조군으로 사용된 *β-actin*의 전사 수준으로 정량 비교 분석하였다. 본 연구에 사용된 특정 qRT-PCR 프라이머 서열은 Table 1과 같다.

Table 1 Primer sequences for real-time PCR analysis of inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), cyclooxygenase 2 (*COX-2*), interleukin 6 (*IL-6*), interleukin 1b (*IL-1b*), and b-actin

Genes	Primer sequence (5'-3')	Accession number
<i>iNOS</i>	F-TCCTACACCACCAAAC R-CTCCAATCTCTGCCTATCC	AF427516.1
<i>COX-2</i>	F-CCTCTGCGATGCTCTTCC R-TCACACTTATACTGGTCAAA	AF233596.1
<i>IL-6</i>	F-CCACTTCACAAGGTCGGAGGCTTA R-GTGCATCATCGCTGTTCATACAATC	DQ788722.1
<i>IL-1β</i>	F-TGTGAAATGCCACCTTTTGA R-TGAGTGATACTGCCTGCCTG	NM_008361.4
<i>β-actin</i>	F-CCCATCTCCTAAGAGGAGGATG R-AGGGAGACCAAAGCCTTCAT	NM_007393.5

통계처리

본 연구로부터 얻어진 실험 결과는 독립적으로 3회 이상 실시되었으며, 평균±표준 오차로 나타내었다. 통계분석은 SPSS (Version 23, IBM, USA)를 통한 일원배치분산 분석(one way ANOVA)을 진행한 후, Duncan’s Multiple Range Test를 수행했다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

미세먼지 PM10에 의한 RAW264.7 대식세포에서의 염증반응 측정

사이토카인, 미토젠, 세균의 지질다당류(LPS) 등에 의해 활성화되는 주요한 면역세포인 대식세포에서는 ROS, 활성질소종, pro-inflammatory cytokines 등의 염증매개 물질 생성을 통하여 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 이들 중 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 활성화로부터 합성되는 NO는 대표적인 염증인자로서 과잉생산 시 급성 및 만성 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Gasparrini et al. 2018; Sharma et al. 2007). 이에 본 연구에서는 만성적으로 노출 시 대식세포에서 염증반응을 일으키는 것으로 알려진 PM10의 RAW264.7 대식세포에서의 염증반응 유발 여부를 확인하기 위하여 100 µg/ml 농도로 PM10을 RAW264.7 대식세포에 처리 후 NO생성량을 측정하였다. Figure 1A에서 보여지는 바와 같이 염증 유도제인 LPS 또는 PM10으로 자극된 RAW264.7 세포에서 NO가 증가되었다. LPS로 유도된 NO 생성량은 미세먼지 입자에 의해 유도된 값보다 높았지만, PM10이 처리된 세포에서 무처리군(Mock)보다 약 2.6배 증가된 NO생성을 보였다(Fig. 1A). 또한 LPS와 PM10으로 처리된 대식세포의 세포 생존율을 MTT 분석을 통해 확인하였

다. 그 결과 LPS 또는 PM10으로 처리된 세포의 생존율이 감소한 것을 통해 두 물질 모두 대식세포에서 독성을 나타냄을 확인 할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과는 LPS 처리와 유사하게 대식세포에서 PM10으로 인하여 염증반응이 유도되고 세포 독성을 나타냄을 확인하였다.

해당화의 대식세포 내 염증발현 억제 효과 확인

서론에도 언급한 바와 같이 항염증효과가 우수하다고 알려진 해당화 추출물의 PM10유도 염증 반응 억제 활성을 조사하기 위하여 PM10 (100 µg/ml)와 해당화 조직 별 추출물 (100 µg/ml)를 RAW264.7 세포에 동시 처리 후 NO 생성량을 측정하였다. Figure 2A에서 보이는 바와 같이 해당화 추출물을 처리한 RAW264.7 세포에서 PM10으로 인해 유도된 NO 생성이 억제되는 것을 조사되었다. 해당화 줄기 추출물에 의하여 PM10유도 NO 생성을 49.4% 억제하였으며, 잎 추출물의 경우 47.2% 억제 효과를 보였다. 이상의 NO 생성 억제 효과가 해당화 추출물의 세포 독성에 의한 것인지를 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 모든 해당화 추출물 처리군에서 미세먼지 입자 단독 처리군과 비교하여 유사한 세포 생존율을 보였으며, 이를 통하여 해당화 추출물들은 RAW264.7 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이상의 연구 결과는 해당화 줄기 및 잎 추출물의 PM10 유도 염증반응 억제 효과는 이들 추출물의 세포 독성에 의한 것이 아님을 시사한다. 줄기 추출물과 잎 추출물 간에 통계상 유의미한 차이는 보이지 않았으나, 줄기 추출물에서 가장 높은 NO 생성 억제 효과를 나타냄에 따라 후속 연구는 줄기 추출물을 이용하여 진행하였다. 염증유발인자인 NO와 prostaglandin E2의 생성은 각각 iNOS와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 주로 이루어진다 (Zhang et al. 2015). 또한 interleukin(IL)-1β, IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokines은 염증반응을 촉진함으로써 세포 노

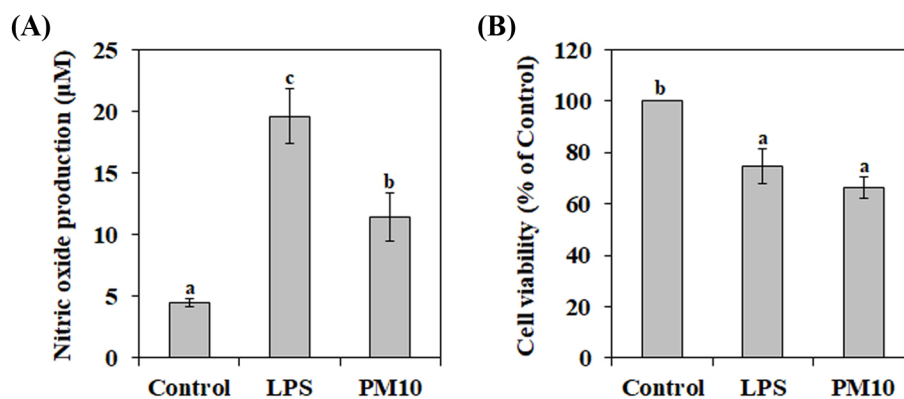


Fig. 1 The inflammatory reaction of RAW264.7 cells to PM10 (ERM-CZ100) stimulation. PM10 affected nitric oxide production (A) and cell viability (B) in RAW264.7 cells. Cells were treated with 100 µg/ml PM10 (ERM-CZ100) or 1 µg/ml lipopolysaccharide, followed by incubation for 24 h. Values represent the mean ± SE of three independent experiments. Different letters indicate significant differences according to Duncan’s multiple range test ($p < 0.05$)

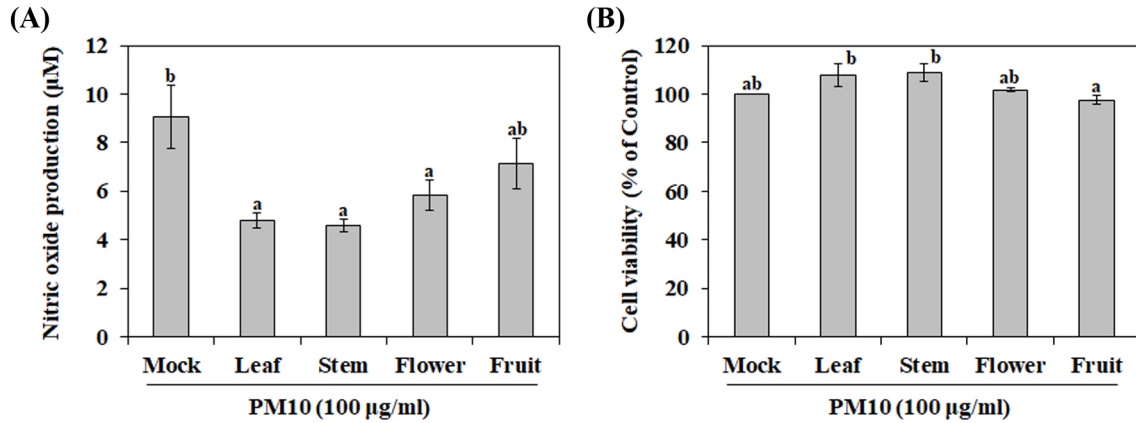


Fig. 2 The anti-inflammatory effects of *R. rugosa* organ extracts on PM10-stimulated RAW 264.7 cells. The effects of each extract on nitric oxide production (A) and cell viability (B) in PM10-stimulated RAW 264.7 cells. Dimethyl sulfoxide--treated samples were used as the mock group. Values represent the mean \pm SE of three independent experiments. Different letters indicate significant differences according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

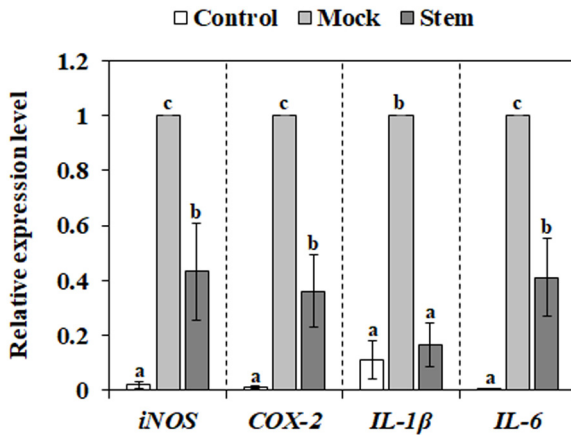


Fig. 3 The effect of stem extract on the expression of PM10-induced pro-inflammatory mediators (inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, interleukin 1b, and interleukin 6). The expression levels of each gene were normalized to actin expression. Dimethyl sulfoxide-, and PM10-treated cells were used as the mock group, whereas non-treated cells were used as the control group. Different letters indicate significant differences according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

화 및 질병 유발에 관여하는 것으로 보고되어 있다(Kany et al. 2019; Toriyabe et al. 2004). 이에 본 연구에서는 PM10 자극으로 유도된 pro-inflammatory cytokines 발현에 해당화 줄기 추출물이 미치는 영향을 real-time PCR을 이용하여 분석하였다. 그 결과 해당화 줄기 추출물을 처리한 RAW264.7 세포에서 *iNOS*, *COX-2*, *IL-1 β* 그리고 *IL-6*의 발현이 유의미하게 감소하였다. 결론적으로, 해당화 줄기 추출물의 PM10유도 염증반응 억제 활성은 *iNOS*, *COX-2* 및 pro-inflammatory cytokines의 발현 억제 기작에 의하여 나타남을 확인 하였다. 또한 이상의 연구 결과를 통하여 해당화 줄기는 미세먼지로 유도되는 염증반응 억제 및 개선을 위한 천연소재로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

직경이 10 µm 미만의 미세먼지 입자(particulate matter 10, PM10)는 한국을 비롯한 동아시아 지역에서 해로운 대기오염의 주요한 원인 중 하나로 최근 주목받고 있으며, 호흡기와 피부에 유해한 영향을 미치는 주범이 되고 있다. FD는 대식세포에서 활성산소 종(ROS)의 생성과 염증반응을 과도하게 촉진시켜 세포 손상과 더불어 세포 사멸을 유도한다. 장미속의 낙엽관목인 해당화(*Rosa rugosa*)는 다양한 질병을 치료하는 목적으로 예부터 동아시아 지역에서 민간요법 치료제로써 사용되었다. 본 연구에서는 PM10으로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증반응을 억제하는 해당화 각 기관별 추출물의 항염증 효과를 탐색하고자 한다. 미세먼지 입자가 처리되지 않은 RAW 264.7 대식세포와 비교했을 때, PM10을 100 µg/ml의 농도로 처리했을 경우 lipopolysaccharide 처리와 유사하게 nitric oxide (NO) 생성을 눈에 띄게 증가시켰다. 또한 100 µg/ml의 해당화 줄기 추출물은 미세먼지 입자 단독 처리군에 비해 NO 생성을 45% 이상 감소시켰고, PM10에 의해 유도된 interleukin(IL)-1 β , IL-6, inducible nitric oxide synthase, and cyclooxygenase-2의 발현을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 해당화 줄기 추출물의 항염증 효과가 PM10으로 자극된 RAW 264.7 세포에서 염증 유발 매개체의 억제에 의해 매개됨을 나타내며, 해당화 줄기가 유해한 공기 중 미세먼지 입자에 의해 유발되는 염증반응에 대한 보호 효과가 있는 천연 자원으로서 가치가 있음을 시사한다.

사 사

본 연구는 산업통상자원부 및 산업기술평가관리원(KEIT) 연구비지원에(과제번호: P0018148) 의해 수행되었다

References

- Calderón-Garcidueñas L, Kavanaugh M, Block M, D'Angiulli A, Delgado-Chávez R, Torres-Jardón R, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Osnaya N, Villarreal-Calderon R, Guo R, Hua Z, Zhu H, Perry G, Diaz P (2012). Neuroinflammation, hyperphosphorylated tau, diffuse amyloid plaques, and down-regulation of the cellular prion protein in air pollution exposed children and young adults. *J Alzheimers Dis.* 28:93-107
- Fernando IP, Kim HS, Sanjeeva KK, Oh JY, Jeon YJ, Lee WW (2017). Inhibition of inflammatory responses elicited by urban fine dust particles in keratinocytes and macrophages by diphlorethohydroxycarmalol isolated from a brown alga *Ishige okamurae*. *Algae.* 32:261-273
- Gasparrini M, Afrin S, Forbes-Hernández TY, Cianciosi D, Reboredo-Rodríguez P, Amici A, Battino M, Giampieri F (2018). Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. *Food Chem Toxicol.* 120:578-587
- Jung HJ, Nam JH, Choi J, Lee KT, Park HJ (2005). 19 α -hydroxyursane-type triterpenoids: antinociceptive anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. *Biol Pharm Bull.* 28:101-104
- Kang NS, Sohn EH (2010). Immunomodulatory effects of fructus and semen from *Rosa rugosa* on macrophages. *Korean J Plant Res.* 23: 399-405
- Kany S, Vollrath JT, Relja B (2019). Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 20:6008
- Kim E, Mok HK, Hyun TK (2022). Variations in the antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory properties of different *Rosa rugosa* organ extracts. *Agronomy.* 12:238
- Kim JW, Um M, Lee JW (2018). Antioxidant activities of hot water extracts from different parts of *Rugosa rose* (*Rosa rugosa* Thunb.). *J Korean Wood Sci Technol.* 46:38-47
- Kwak M, Eom SH, Gil J, Kim JS, Hyun TK (2019). Variation in bioactive principles and bioactive compounds of *Rosa rugosa* fruit during ripening. *J Plant Biotechnol.* 46:236-245
- Lee JW, Seok JK, Boo YC (2018). Ecklonia cava extract and dieckol attenuate cellular lipid peroxidation in keratinocytes exposed to PM10. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018:8248323
- Park BJ (2008). Isolation of main component and antioxidant activities on the stem and root of *Rosa rugosa*. *Korean J Plant Res.* 21:402-407
- Park S, Seok JK, Kwak JY, Suh HJ, Kim YM, Boo YC (2016). Anti-inflammatory effects of pomegranate peel extract in THP-1 cells exposed to particulate matter PM10. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016:6836080
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 15:252-259
- Toriyabe M, Omote K, Kawamata T, Namiki A (2004). Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology.* 101:983-990
- Yoo TK, Jeong WT, Kim JG, Ji HS, Ahn MA, Chung JW, Lim HB, Hyun TK (2021). UPLC-ESI-Q-TOF-MS-Based metabolite profiling, antioxidant and anti-inflammatory properties of different organ extracts of *Abeliophyllum distichum*. *Antioxidants.* 10:70
- Zhang DD, Zhang H, Lao YZ, Wu R, Xu JW, Murad F, Bian K, Xu HX (2015). Anti-inflammatory effect of 1, 3, 5, 7-tetrahydroxy-8-isoprenylxanthone isolated from twigs of *Garcinia esculenta* on stimulated macrophage. *Mediators Inflamm.* 2015:350564