

Anti-inflammatory Effects of *Rumohra adiantiformis* Extracts Fermented with *Bovista plumbea* Mycelium in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells

Ji-Hye Hong¹, Eun-Seo Jang¹, Myung-Chul Gil², Gye Won Lee^{1*} and Young Ho Cho^{1*}

¹Department of Pharmaceutics & Biotechnology, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

²R & D Center PLUTO Inc, Seongnam 13453, Korea

Received March 3, 2023 / Revised April 25, 2023 / Accepted May 7, 2023

This study was designed to evaluate the anti-inflammatory effects of *Rumohra adiantiformis* extracts fermented with *Bovista plumbea* mycelium (B-RAE) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The total polyphenol and total flavonoid content of B-RAE were 379.26±7.77 mg/g and 50.85±3.08 mg/g, respectively. The results of measuring the antioxidant activity of B-RAE showed that it scavenges 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), and superoxide anion radical in a dose-dependent manner. B-RAE inhibited nitric oxide (NO) production in a dose-dependent manner without affecting cell viability. The gene expression of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6 was measured using real time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). We found that, compared to the LPS-treated group, B-RAE significantly reduced the mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines in a concentration-dependent manner. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), the phosphorylation of transcription factors such as nuclear factor- κ B (NF- κ B), and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway proteins were assessed using Western blot analysis. We found that B-RAE significantly suppressed the expression of iNOS and COX-2, but their expression was increased by LPS treatment. In addition, the phosphorylation of NF- κ B and I κ B, which was increased by LPS treatment, was reduced with B-RAE treatment. The effect of B-RAE on the phosphorylation of the MAPK signaling pathway proteins was measured, and the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and the p38 MAPK proteins decreased in a dose-dependent manner, while the phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) increased. These anti-inflammatory effects of B-RAE may thus have been achieved through the high antioxidant activity, the inhibition of NO production through the suppression of iNOS and COX-2 expression, the inhibition of the NF- κ B pathway, and the suppression of pro-inflammatory cytokine expression.

Key words : Anti-inflammation, *Bovista plumbea*, COX-2, iNOS, *Rumohra adiantiformis*

서론

현대사회에서는 생활수준의 향상과 고령화의 증가로 인해 건강과 아름다움에 대한 소비자의 관심이 꾸준히 높아지고 있으며, 이에 따라 기능성 화장품 및 건강기능식품의 수요가 증가하고 있다. 이에 따라 화장품 및 건강

기능식품의 소재 개발에 대한 연구도 활발하게 진행되어 왔으나, 새로운 소재 개발에는 한계가 나타나 화장품 및 건강기능식품 시장 진출을 위한 새로운 기술 개발이 요구되고 있다.

현재까지 천연물로부터 유용성분을 추출하고 생리활성을 규명한 연구에는 피부노화 억제에 대한 연구가 가장 많은 부분을 차지하고 있으며 그 외 기미, 주근깨 등 색소 침착 피부질환과 뾰루지, 염증성 여드름 등의 피부 트러블을 개선시키는 소재에 대한 연구가 활발히 진행되어져 왔다[4]. 피부질환의 생리학적인 기전은 염증반응의 과정을 거치기도 하며, 다양한 염증 반응의 경로를 통해 피부 표피층과 진피층의 결합 조직에 영향을 미치는 효소들인 hyaluronidase, elastase, collagenase 등의 발현을 증가시킨다[30].

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균의 세포벽에서

*Corresponding authors

Tel : +82-42-600-8502, Fax : +82-42-600-8502

E-mail : pckmon@konyang.ac.kr

Tel : +82-42-600-8503, Fax : +82-42-600-8503

E-mail : micael@konyang.ac.kr

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.

유도된 화합물로 염증성 사이토카인의 강력한 유도제로 알려져 있다[17]. LPS에 의하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인의 발현과 생성이 증가되며, 염증성 매개체인 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E2 (PGE2)를 생성하는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현이 증가된다[33]. 이러한 사이토카인들과 염증성 매개체들은 대식세포를 활성화시키고 급성 및 만성 염증반응을 일으키는 매개체로 작용한다[23, 35]. 따라서 이러한 염증성 사이토카인과 관련 매개체를 조절하는 것은 항염증 소재 개발을 위한 중요한 요소이다.

생물전환기술(Bioconversion)은 미생물이 가지고 있는 효소적 기능을 이용하여 전구물질로부터 원하는 산물을 제조하는 기술이다. 미생물 발효 또는 효소처리 등의 생물학적 방법을 통해 천연물 생리활성물질의 구조적 변화를 유도하여 안전성 증대, 유효성분의 함량 증가, 흡수율 개선, 기능성 증진 등 기존 소재의 활용성을 제고할 수 있다[25]. 또한, 생물전환기술은 다양한 소재와 미생물 혹은 효소의 매칭을 통해 무수히 많은 신규 소재를 확보할 수 있고 유기용매 등 독성물질을 사용하지 않으므로 친환경적 공정개발이 가능하며, 공정효율성을 높일 수 있는 등의 장점을 지닌다[19, 31].

루모라고사리(*Rumohra adiantiformis*)는 진녹색의 삼각형 형태를 하고 있는 잎이 특징이며, 남아프리카, 남아메리카, 파푸아뉴기니, 호주 등이 원산지인 양치식물이다. 루모라고사리에는 베타 엑티손, 아스파라긴산, 글루타민산 등의 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 루모라고사리에 대한 체계적인 효능 검증은 미약한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 말벌버섯과에 속하는 식용버섯인 참쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체를 발효균주로 사용하여 생물전환 루모라고사리 추출물을 제조하였다. 제조된 생물전환 루모라고사리 추출물의 항산화 효과 및 항염증 효과를 검증함으로써 기능성 화장품 소재로서의 활용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약

실험에 사용된 마우스 대식세포주(RAW 264.7)는 American Type Culture Collection (ATCC, Fredrick, MD, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 구입한 세포는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin (Pen-Strep)이 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-170AIC, Panasonic, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

본 실험에 사용된 시약으로 DMEM, FBS 및 Pen-Strep는

Gibco BRL (Eggenstein, Germany)에서, griess reagent system는 Promega (Madison, WI, USA)에서, iQ SYBR Green Supermix는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서, TRI reagent, Folin & Ciocalteu's phenol, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)는 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외에 사용된 시약들은 특급 및 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

생물전환 루모라고사리 추출물 제조

본 실험에 사용한 루모라고사리는 테라팜(Busan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 음건하여 분쇄한 루모라고사리 분말 30 g에 70%(v/v) 에탄올 300 ml를 가해 환류추출기(Universal Extraction E-800, Buchi, Switzerland)를 이용해 추출(3 cycles, 3 times)한 후 와트만(Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 40°C 이하에서 감압농축 및 동결건조하여 루모라고사리 추출물을 제조하였다. 탄소원으로 루모라고사리 추출물과 질소원으로 0.1% 효모-맥아즙이 혼합된 배지에 ㈜코씨드바이오팜(Cheongju, Korea)에서 분양받은 참쌀떡버섯(*B. plumbea*) 균사체를 균질화하여 3.3% 되도록 접종한 후 발효조 내에서 온도 25°C, 회전수 125 rpm의 조건으로 7일간 배양하였다. 배양 후 배양액으로부터 참쌀떡버섯 균사체를 제거한 다음 동결건조하여 생물전환 루모라고사리 추출물(*R. adiantiformis* extract fermented with *B. plumbea*, B-RAE)을 제조하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Dennis의 방법[7]으로 측정하였으며, Folin-Ciocalteu's reagent가 폴리 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용하였다. 희석한 시료에 증류수를 첨가하여 1 N Folin-Ciocalteu's reagent를 넣어 8분간 방치한 다음, 10% sodium carbonate를 가하여 40분간 반응시킨 뒤 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준검량곡선으로부터 환산하여 정량하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량의 측정은 Moreno 등[21]의 방법을 이용하여 측정하였다. 1.5 ml tube에 각 농도 별 시료를 가한 후 99.5% ethyl alcohol 300 μ l와 10% aluminum nitrate 20 μ l, 1 M potassium acetate 20 μ l, 증류수 560 μ l를 차례대로 넣어 교반 후 40분간 정지한 다음 425 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준검량곡선으로부터 환산하여 정량하였다.

DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능 측정은 Blois법[3]에 따라 실시하였다. 96 well plate에 추출물을 농도별 20 µl씩 각각 취한 다음 실험군에는 0.1 mM DPPH 180 µl, 대조군에는 메탄올을 첨가하여 20분간 혼합한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거능을 구하였다.

ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능 측정은 Re 등[28]의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 암소에서 24시간 동안 반응시켜 ABTS radical이 형성된 ABTS stock solution을 제조한 후, 증류수를 이용하여 흡광도가 0.70±0.02 범위에 들도록 희석시켜 ABTS working solution을 제조하였다. ABTS working solution 270 µl와 시료 30 µl를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS radical 소거능을 구하였다.

Superoxide anion radical 소거능 측정

Superoxide anion radical 소거능 측정은 Nishikimi 방법 [22]을 변형하여 측정하였다. 3 mM xanthine sodium salt와 0.6 mM nitro blue tetrazolium (NBT) 용액, 15 mM Na₂-EDTA 용액, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 각각 혼합하고, 농도 별로 희석한 추출물과 50 mM xanthine oxidase (0.1 units/ml)를 첨가하였다. 5분간 차광 및 37°C에서 15분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 superoxide anion radical 소거능을 구하였다.

환원력 측정

추출물의 환원력(reducing power)은 ferric ferricyanide (Fe³⁺)가 ferrous (Fe²⁺) 형태로 환원될 때 푸른색을 띠는 원리를 이용하는 Oyaizu 방법[23]에 따라 측정하였다. 농도 별로 희석한 추출물에 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide를 차례로 가하여 50 °C에서 20분간 반응하였다. 반응액에 10% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 멈춘 후, 2,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액을 96 well plate에 넣고 실험군에는 1% iron(II) chloride를, 대조군에는 시료를 녹인 용매인 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포생존율

B-RAE의 세포에 대한 독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 각각 1×10⁴ cells/ml의 농도로 동일하게 분주하여 배양한 후 B-RAE를 농도별로 100 ng/ml LPS와 동시 처리하여 CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. MTT 용액(5 mg/ml) 10 µl를 첨가하여 반응시킨 뒤 DMSO 100 µl를 첨가하여 생성된 formazan을 녹여낸 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 측정

NO 생성 저해능을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 96-well plate에 well 당 1×10⁴ cells/ml의 농도로 동일하게 분주하여 배양한 후 농도별 B-RAE를 100 ng/ml LPS와 동시 처리하여 CO₂ incubator에 18시간 배양하였다. NO 생성 저해능은 griess reagent system으로 측정하였으며, 즉, 상등액 50 µl에 sulfanilamide solution 50 µl를 가하고 5분 반응 후 naphthalene diamine dihydrochloride (NED) solution 50 µl를 첨가하여 5분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

염증성 사이토카인 측정

염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해서 실시간 정량적 PCR (real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, real time qRT-PCR)을 실시하였다. 세포를 6-well plate에 2×10⁴ cells/ml의 농도로 분주하여 배양한 후, B-RAE를 농도별로 100 ng/ml의 LPS와 동시 처리하여 CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. 그 후 세포를 TRIzol 시약을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. PCR thermal cycler device (Takara Bio, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하고, QuantStudio 1 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)에서 iQ SYBR Green Supermix를 사용하여 실시간 정량적 PCR을 수행하였다. IL-1β, IL-6, TNF-α, GAPDH용 PCR 프라이머는 Cosmo Genetech (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였고, 각각의 프라이머 서열은 Table 1에 나타내었다.

Western blot 분석을 이용한 단백질 발현 측정

B-RAE의 항염증 작용기전을 알아보기 위하여 전사인

Table 1. The primer sequences used for quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
IL-1β	5'-AGTTGACGGACCCCAAAGA-3'	5'-GGACAGCCCAGGTCAAAGG-3'
IL-6	5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3'	5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'
TNF-α	5'-TCCTTGATGGTGGTGCATGA-3'	5'-CACAAGATGCTGGGACAGTGA-3'
GAPDH	5'-CATGGCCTCCGTGTTCCCTA-3'	5'-GCGGCACGTGATCCA-3'

Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents of *R. adiantiformis* extract fermented with *B. plumbea* (B-RAE) and *R. adiantiformis* extract

Sample	Contents (mg/g)	
	Total polyphenol ¹⁾	Total flavonoid ²⁾
B-RAE	379.26±7.77	50.85±3.08
RAE	264.89±2.35	26.15±1.14

The values are mean ± SD (n=3).

¹⁾A standard compound was tannic acid for total polyphenol assay.

²⁾A standard compound was quercetin for total flavonoid assay.

자인 NF-κB와 mitogen- activated protein kinase (MAPK) 신호경로 단백질의 인산화 및 염증 관련 단백질(iNOS, COX-2)의 발현을 Western blot 분석으로 확인하였다. RAW 264.7 세포를 6-well plate에 2×10⁴ cells/ml의 농도로 분주하여 배양하고, B-RAE를 농도별로 100 ng/ml의 LPS와 동시 처리하여 CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. 그 후 세포 내 단백질을 passive lysis buffer로 추출하여 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하였다. 단백질은 8% mini gel sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 분리한 후, 0.45 μm nitrocellulose membrane에 transfer 하고 5% skim milk로 1시간 동안 blocking 하였다. 그 후 희석한 1차 항체와 membrane을 4°C에서 24시간 동안 반응시키고 세척한 후 1시간 동안 실온에서 horse radish peroxidase (HRP)가 컨쥬레이션된 2차 항체와 반응시켰다. 이 때 단백질 발현은 Amersham ImageQuant 800 (Cytiva, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 각 군간의 통계적 유의성 검증은 SPSS 18.0 (SPSS Inc., IL, USA)을 이용한 one-way ANOVA로 하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

생물전환을 통한 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 증가
 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 페놀성 화합물에 존재하는 phenolic hydroxyl기는 단백질 등과 결합하는 성질을 가지며 항산화, 항염 및 항균 효과 등의 생리 활성을 가지는 것으로 알려져 있다[6, 9, 15]. 또한, 식물에 널리 분포되어 있는 플라보노이드 성분도 항산화 활성을 포함하여 여러가지 생리 활성 기능이 있음이 많은 연구에서 밝혀졌다[11, 12, 14]. 따라서 B-RAE의 항산화 활성을 예측하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 그 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 B-RAE의 총 폴리페놀 함량은 379.26 ± 7.77 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 50.85 ± 3.08로 나타났다. 이러한 결과는 생물전환을 하기 전 추출물인 루모라고사리 추출물(RAE)의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 각각 264.89 ± 2.35 mg/g과 26.15 ± 1.14 mg/g로 나타난 것에 비하여 높게 나타났다. 이러한 결과는 Lee 등[16]이 보고한 지실 추출물 보다 영지버섯 균사체로 생물전환한 지실 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 증가한다는 결과와 일치하며, 이는 생물전환 균주로 사용된 참쌀떡버섯 균사체가 배양되는 과정에서 고분자 페놀 화합물이 저분자로 분해 또는 파괴되는 과정에서 새로운 페놀 화합물들이 생성되었기 때문이라 사료된다.

B-RAE의 DPPH, ABTS 및 Superoxide anion radical 소거활성

DPPH radical 소거활성 측정은 다양한 천연소재의 항산화 효능을 알아보기 위해 많이 이용되며 화학적으로 안정화된 자유 라디칼을 가지고 있는 물질인 DPPH가 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 짙은 자주색으로 탈색되는 원리를 이용한다[1]. B-RAE의 DPPH radical 소거 활성을 측정할 결과를 Table 3에 나타내었다. 즉, B-RAE의 SC₅₀ (radical을 50% 소거하는 시료의 농도)은 15.70 ± 0.17 μg/ml, 양성 대조군인 비타민 C의 SC₅₀은 4.36 ± 0.18 μg/ml로 각각 나타났다. 비타민 C의 소거활성에는 미치지 못하였으나, B-RAE의 경우 추출물임에도 불구하고 단일 물질인 비타

Table 3. Effect of *R. adiantiformis* extract fermented with *B. plumbea* (B-RAE) on DPPH, ABTS and superoxide anion radical scavenging activity

Samples	Antioxidant activity (SC ₅₀ , μg/ml)		
	DPPH radical	ABTS radical	Superoxide anion radical
B-RAE	15.70±0.17	3.14±0.04	4.15±0.63
L-ascrohic acid	4.36±0.18	-	4.53±0.07
BHA	-	1.14±0.03	-

The values are mean ± SD (n=3).

민 C에 뒤지지 않는 radical 소거활성을 나타내었다.

ABTS radical 소거활성 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 자유 라디칼이 시료의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색 되는 원리를 이용한 방법이다[10]. 양성 대조군으로 3-t-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)를 이용하여 B-RAE의 ABTS radical 소거 활성을 비교한 결과를 Table 3에 나타내었다. 양성 대조군인 BHA의 SC₅₀은 1.14±0.03 µg/ml, B-RAE는 3.14±0.04 µg/ml로 각각 나타나 단일 물질인 BHA에 뒤지지 않는 소거 활성을 나타내었다.

Superoxide anion radical은 호기성 세포의 효소 및 비효 소적 단계에서 생성되는 radical로 독성이 매우 강하고 노 화와 관련된 산화 반응의 개시단계에 관여한다[5]. 또한, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen 등과 같 은 다른 활성산소종의 생성에 관여하여 지질, 단백질, DNA 등에 산화적 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다[13]. B-RAE의 superoxide anion radical 소거활성을 측정하여 Table 3에 나타내었다. B-RAE의 SC₅₀은 4.15±0.63 µg/ml, 양성 대조군인 비타민 C는 4.53±0.07 µg/ml로 각각 나타나 단일 물질인 비타민 C와 동등한 소거활성을 나타내었다.

B-RAE의 환원력 활성

환원력은 활성산소 및 유리기에 전자를 공유하는 능력 을 뜻하며, Fe³⁺가 Fe²⁺로 환원될 때 발생하는 청색 파장을 700 nm에서 측정하여 흡광도 값으로 나타낸 값으로 시료 의 환원력을 측정하는 방법으로 radical 소거활성 측정 방 법과는 다른 메커니즘의 항산화 효과 측정 방법이다[33]. B-RAE의 환원력은 radical 소거활성과 마찬가지로 시료의 농도가 증가할수록 환원력이 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1). 따라서 B-RAE는 다른 식물 추출물에 비하여 폴리 페놀과 플라보노이드 함량이 높아 항산화 활성 평가 지표 인 radical 소거활성과 환원력이 높은 것으로 사료된다.

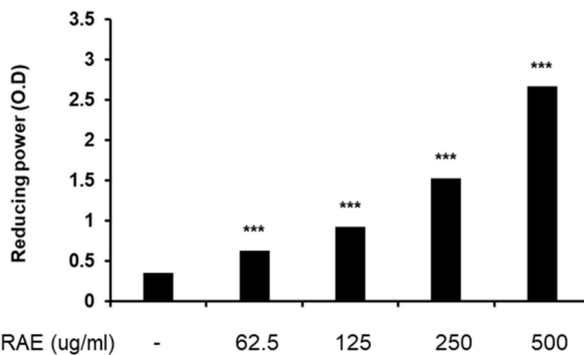


Fig. 1. Reducing power of *R. adiantiformis* extract fermented with *B. plumbea* (B-RAE). All data are shown as the mean ± SD of three independent experiments. Significance was determined by one-way ANOVA. ****p*< 0.001 vs control (con).

Raw 264.7 세포 생존율 및 LPS로 유도된 NO의 생성에 미치는 B-RAE의 영향

대식세포는 염증 반응에 관여하는 세포로 알려져 있 으며, 여러 자극원 또는 다른 세포가 분비하는 사이토카인 에 의해 활성화 된다. 이러한 대식세포에 의해 부종, 열, 통증 등의 염증 반응이 유발되고 염증 부위로 다른 면역 세포들을 이동시킨다[18]. LPS는 그람 음성 박테리아의 외 부 세포막을 구성하는 성분이며, 대식세포의 활성화 인자 이다. 대식세포에 LPS 자극 시 생성되는 NO는 높은 반응 성을 가진 생체 분자로, NO synthase (NOS)에 의해 L-argi-nine으로부터 생성된다. NO는 신호전달기능, 혈관 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여한다. 특히, 대식세포가 LPS로 자극될 때 iNOS가 발현되고 iNOS는 L-arginine을 L-citrulline으로 전환하면서 NO를 생성하게 되며, 이렇게 생성된 NO는 염증 반응을 유도하는 역할을 한다[20]. 대 식세포인 RAW 264.7 세포를 이용한 B-RAE의 NO 생성 억제 효능을 평가하기에 앞서 세포 생존에 영향을 미치는 지 여부를 MTT assay로 확인하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. RAW 264.7 세포에 B-RAE를 농도별로(25~ 200 µg/ml) 24시간 처리하였을 때 90% 이상의 세포 생존 율을 나타내 세포 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 2A). LPS를 B-RAE와 동시 처리한 세포에서는 LPS 단독 처리 군에서 감소된 세포 생존율이 시료 처리 농도구간에서 5% 정도 세포 생존율이 유의적으로 증가함을 확인하였다 (Fig. 2B). B-RAE의 NO 생성 저해능을 측정한 결과 LPS 단독 처리시 증가된 NO 생성량이 B-RAE 처리 시 농도의 존적으로 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타나 B-RAE의 염증 억제에 대한 가능성을 확인하였다(Fig. 3C).

RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 전염증성 사이토카 인 발현에 미치는 B-RAE의 영향

세포에서는 LPS와 같은 자극에 의하여 염증 반응에 관 계된 사이토카인의 생산이 촉진되며, 특히 RAW 264.7 세 포와 같은 macrophage 또는 monocyte에서는 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 전염증성 사이토카인들의 발현을 증가시키 는 것으로 알려져 있다[2, 8, 31]. 따라서 본 연구에서는 B-RAE가 전염증성 사이토카인의 생성 억제에 미치는 영 향을 살펴보기 위해 LPS 유도 RAW 264.7 세포에 B-RAE 를 처리하여 IL-6, IL-1β 및 TNF-α의 mRNA 발현 변화를 qRT-PCR로 확인하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같 이 LPS 처리 시 증가된 전염증성 사이토카인의 mRNA 발 현이 B-RAE 처리 시 LPS 처리군에 비해 농도 의존적으로 발현이 감소하는 것으로 확인되었다. 즉, IL-6, IL-1β 및 TNF-α의 발현이 LPS 처리군에서 각각 24배, 18배, 23배 증가되는 것으로 나타났고, 농도별 B-RAE (25~200 µg/ml) 를 동시 처리하였을 때 유전자 발현이 IL-6는 대조군 대비 23배, 20배, 15배, 12배 증가하였고(Fig. 3A), IL-1β는 17배,

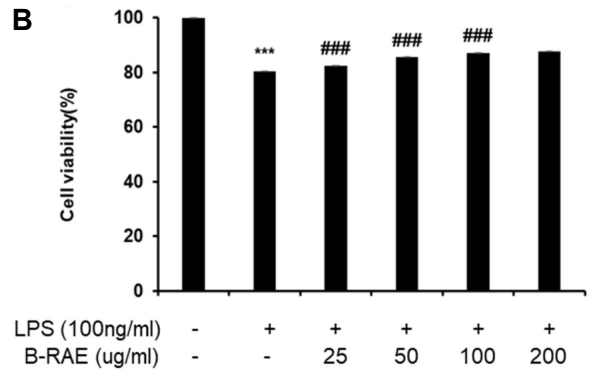
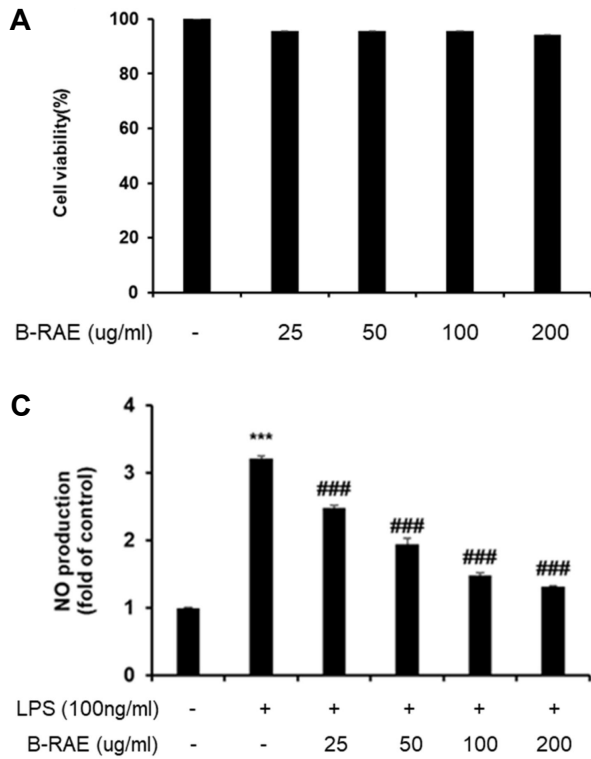


Fig. 2. Effect of B-RAE on cell viability and NO production in RAW 264.7 cells. Cells were treated with B-RAE and LPS 100 ng/ml for 24 hr. Cell viability (A and B) was determined by MTT assay. NO production (C) was determined by Griess reagent system. All data are the mean±SD of three independent experiments (^{***}*p*< 0.001 vs negative control; ^{###}*p*<0.001 vs LPS only treatment).

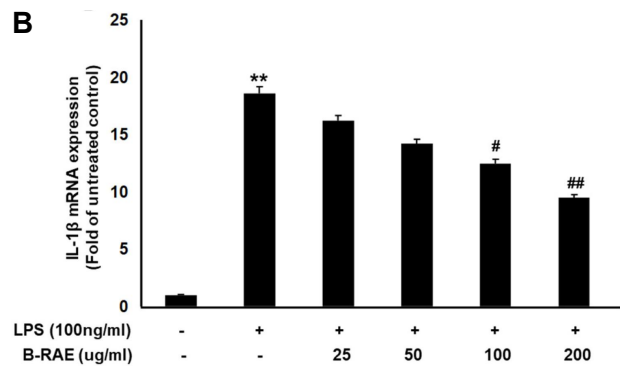
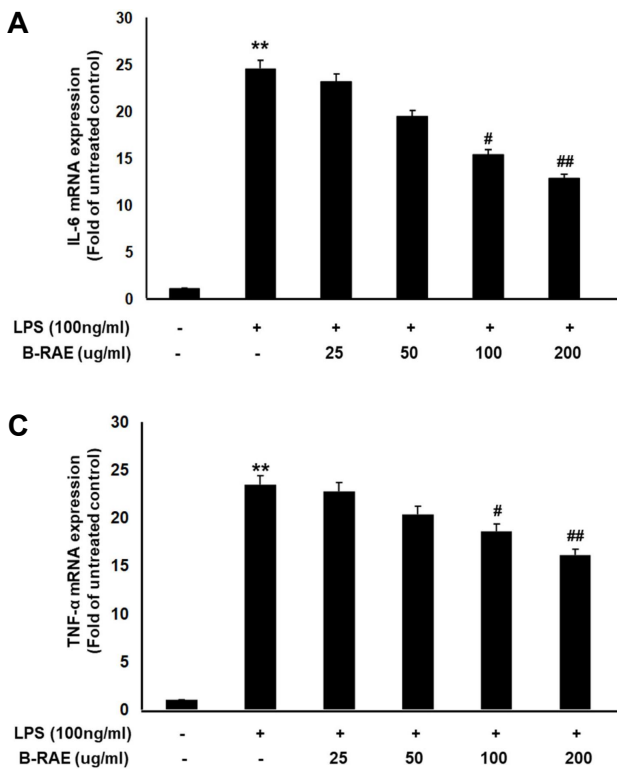


Fig. 3. Effect of B-RAE on expression of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were treated with B-RAE and LPS for 24 hr. mRNA expression of IL-6 (A), IL-1β (B), and TNF-α (C) was measured by qRT-PCR. GAPDH was used as an internal control. All data are the mean ± SD of three independent experiments (^{**}*p*<0.01 vs negative control; [#]*p*<0.05 and ^{##}*p*<0.01 vs LPS only treatment).

14배, 13배, 10배 증가하였으며(Fig. 3B), TNF-α는 23배, 21배, 18배, 16배 증가하는 것으로 나타나(Fig. 3C), B-RAE 처리에 의해 LPS에 의해 유도된 사이토카인의 mRNA 발

현이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. IL-6, IL-1β 및 TNF-α와 같은 전염증성 사이토카인들의 발현 증가는 대식 세포를 활성화시키고 급성 및 만성 염증반응을 일으키는

것으로 알려져 있어[18], B-RAE은 전염증성 사이토카인의 발현 저해를 통한 항염증 효능이 있을 것으로 사료된다.

RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 염증 관련 단백질 발현에 미치는 B-RAE의 영향

B-RAE가 LPS 유도 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 및 전염증성 사이토카인의 유전자 발현을 감소시키는 것으로 나타나 B-RAE의 항염증 작용 기전을 알아보기 위하여 염증 관련 단백질(iNOS, COX-2)의 발현 및 전사인자인 NF-κB와 MAPK 신호경로 단백질의 인산화에 미치는 영향을 Western blot 분석으로 확인하였다. iNOS는 L-아르기닌으로부터 NO를 생성하는 반응을 촉매하는 효소이며

[17], COX-2는 염증반응 및 대식세포에 의한 염증성 사이토카인 합성을 조절하는 PGE2 생성을 촉매하는 효소이다 [23]. Fig. 4에 나타난 바와 같이 B-RAE 처리군에서 LPS 처리군에 비하여 iNOS와 COX-2의 발현이 억제되는 것으로 나타났다. 즉, iNOS의 경우 B-RAE 처리 농도에 관계없이 LPS 처리에 의해 증가된 iNOS의 발현을 약 1.3배 정도 억제하였고(Fig. 4B), COX-2의 경우 B-RAE 처리 농도의존적으로 LPS 처리에 의해 증가된 COX-2의 발현을 1~1.4 배 정도 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). 이러한 결과는 B-RAE가 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제를 통하여 항염증 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

B-RAE의 항염증 활성과 전사인자인 NF-κB 신호전달

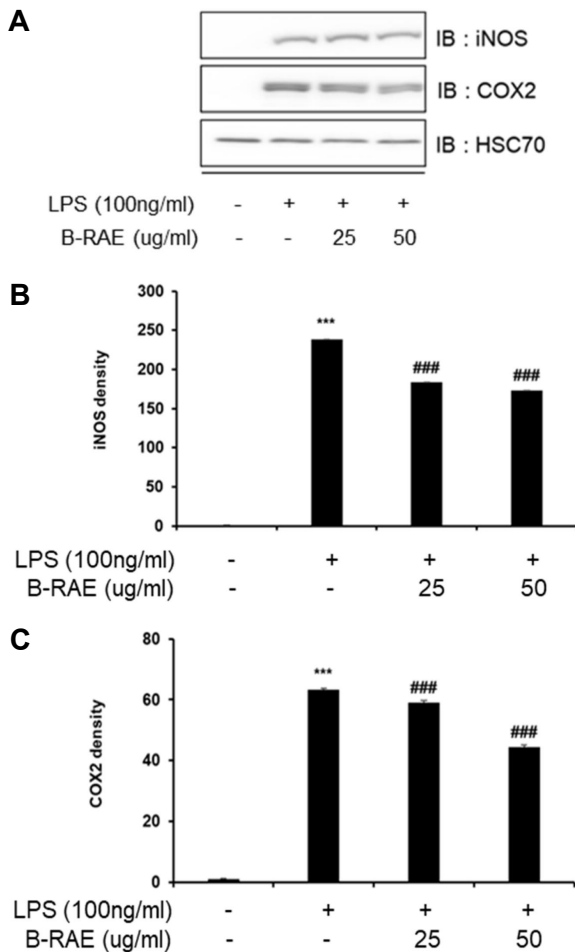


Fig. 4. Effect of B-RAE on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of iNOS and COX-2 were measured by Western blot analysis. HSC 70 was used as an internal control (A). Protein expression was quantified with image J program. (B) iNOS/HSC70, (C) COX-2/HSC70 density. All data are the mean ± SD of three independent experiments (***p*<0.001 vs negative control; ###*p*<0.001 vs LPS only treatment).

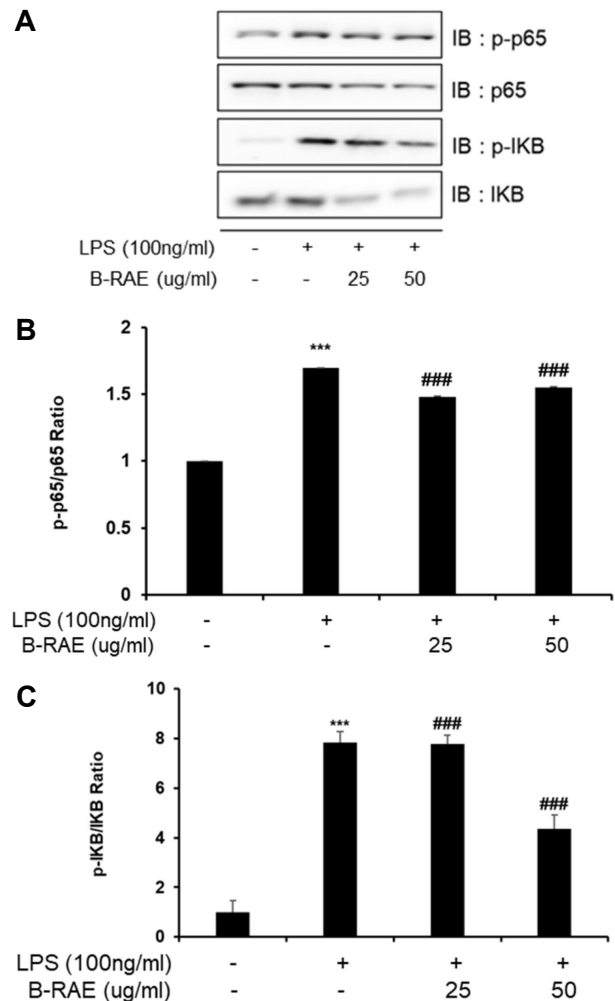


Fig. 5. Effect of B-RAE on p65/p-p65 and p-IκB/IκB expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of p-p65/p65 and p-IκB/IκB were measured by western blot analysis (A). Protein expression was quantified with image J program. (B) p-p65/p65 ratio, (C) p-IκB/IκB ratio. All data are the mean ± SD of three independent experiments (***p*<0.001 vs negative control; ###*p*<0.001 vs LPS only treatment).

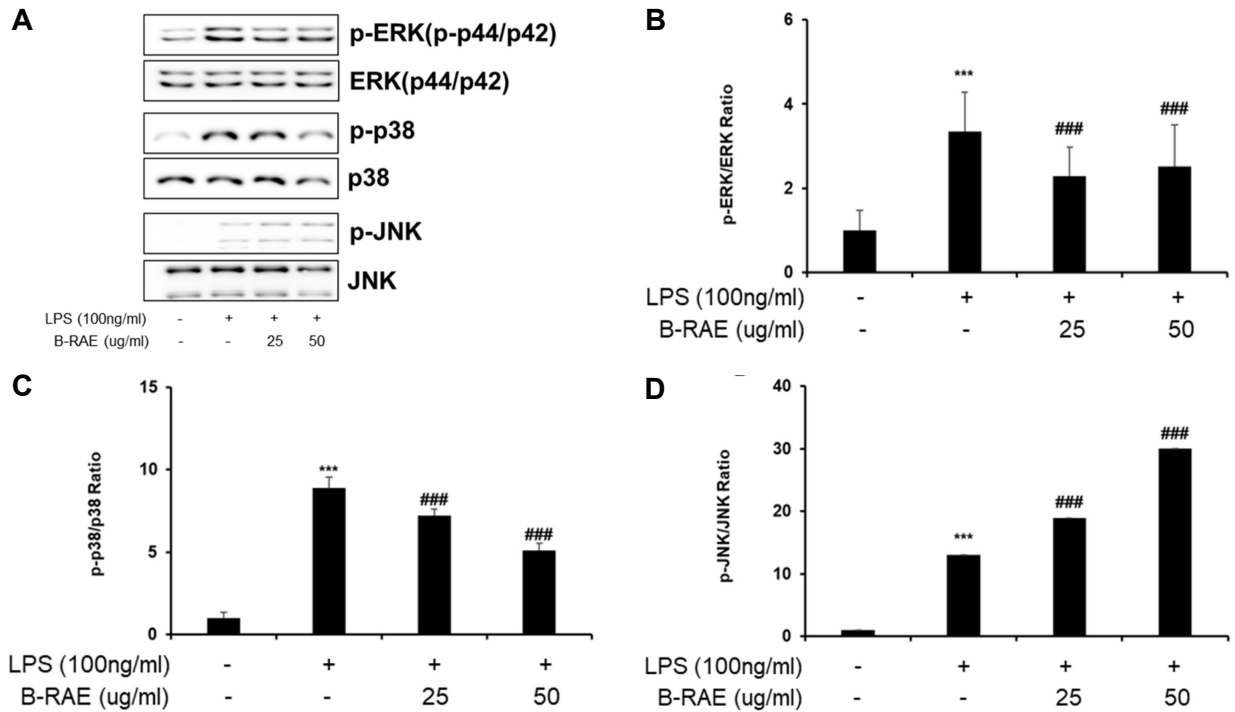


Fig. 6. Effect of B-RAE on phosphorylation of MAPKs in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of p-ERK/ERK, p-p38/p38, and p-JNK/JNK were measured by Western blot analysis (A). Protein expression was quantified with image J program. (B) p-ERK/ERK ratio, (C) p-p38/p38 ratio, (D) p-JNK/JNK. All data are the mean \pm SD of three independent experiments (***) $p < 0.001$ vs negative control; ### $p < 0.001$ vs LPS only treatment).

경로와의 연관성을 확인하기 위하여 NF- κ B 단백질의 발현과 인산화에 미치는 영향을 측정하였다. P65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) 그리고 p52/p100 (NF- κ B2) 와 같은 5종의 subunit으로 구성된 NF- κ B family는 300개의 아미노산으로 구성된 전사인자로 I κ B와 결합된 상태에서 불활성화 된다. I κ B가 I κ B 인산화효소에 의해 인산화되어 분해가 될 경우 NF- κ B는 활성화되어 핵 안으로 이동하여 전염증성 사이토카인 유전자의 프로모터나 인핸서 부위에 결합하여 이들 유전자의 발현을 유도한다 [28]. Fig. 5에 나타난 바와 같이 LPS에 의해 증가된 p65와 I κ B의 인산화가 B-RAE 처리에 의해 감소되는 것으로 나타났다. 즉, p65의 인산화는 B-RAE 처리 농도 의존적인 감소는 없었지만 전 처리농도에서 LPS 처리군 대비 유의적인 감소를 나타내었으며(Fig. 5B), I κ B의 인산화는 B-RAE 처리 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 5C). 이러한 결과는 p65의 인산화 및 I κ B의 인산화를 억제하는 즉, NF- κ B 경로 저해를 통한 전염증성 사이토카인의 발현을 억제시키는 것으로 사료된다.

B-RAE의 항염증 활성화와 MAPK 신호경로와의 연관성을 확인하기 위하여 MAPK 단백질의 발현과 인산화에 미치는 영향을 측정하였다. 세포에서 염증과 관련된 다양한 세포 신호전달 경로에서 중요한 역할을 하는 MAPK에는 ERK, JNK, p38 MAPK, ERK5, ERK3/4, NLK, BMK1 등이

있으며, 특히, ERK, JNK와 p38 MAPK는 염증성 사이토카인의 발현을 조절하는 데 중요한 역할을 한다[27]. Fig. 6에 나타난 바와 같이 LPS 처리에 의하여 증가된 ERK와 p38 MAPK 단백질의 인산화가 B-RAE에 의해 감소되었다. 즉, ERK의 인산화는 B-RAE 처리 농도 의존적인 감소는 없었지만 전 처리농도에서 LPS 처리군 대비 유의적인 감소를 나타내었으며(Fig. 6B), p38 MAPK의 인산화는 B-RAE 처리 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 6C). 이러한 결과는 B-RAE가 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포의 염증반응에서 MAPK 경로 중 ERK와 p38 MAPK 억제를 통해 염증반응을 저해할 수 있는 가능성을 제시한다. 반면에 JNK의 경우에는 LPS와 B-RAE 동시 처리시 LPS 단독 처리군에 비하여 B-RAE 처리 농도 의존적으로 인산화가 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 6D). Rabha 등[26]은 급성 폐손상 마우스 모델에서 kaempferol의 JNK 인산화와 염증 반응에 대한 효과를 검증한 결과 kaempferol 처리에 의해 JNK의 인산화가 증가한다고 보고하였다. 이러한 결과는 kaempferol이 LPS 처리에 의해 유발되는 염증성 신호에 대한 세포의 반응을 증강시켜서, JNK의 인산화를 증강시킨 것으로 사료된다. 또한, kaempferol이 세포의 항산화 작용을 증가시켜서 LPS 처리에 의해 유발되는 산화 스트레스를 감소시키는 것으로 알려져 있어, 이러한 작용이 JNK의 인산화 증가와 관련이 있을

것으로 사료된다. B-RAE의 경우도 우수한 항산화 효과로 인하여 JNK의 인산화가 증가된 것으로 추측할 수 있으나 향후 추가적인 실험을 통하여 검증되어야 할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서 B-RAE의 항염증 효과는 높은 항산화 활성, iNOS와 COX-2 발현 억제를 통한 NO 생성 억제, NF- κ B 경로 저해, MAPK 신호경로 조절 및 전염증성 사이토카인 발현 저해에 의해 가능하다는 것을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINC 3.0)의 연구결과입니다(NTIS NO. 1345356198).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Al-sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M. and Sen, P. 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J. Exp. Biol.* **37**, 124-130.
- Bhattacharyya, A., Pathak, S., Datta, S., Chattopadhyay, S., Basu, J. and Kundu, M. 2002. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B regulate Helicobacter pylori-mediated interleukin-8 release from macrophages. *J. Biochem.* **368**, 121-129.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1203.
- Chem, J. S., Wei, C. and Marshall, M. R. 1991. Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.
- Chung, H. J. and Jeon, I. S. 2011. Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. *Kor. J. Food Preserv.* **18**, 739-745.
- Droge, W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Folin, A. D. and Denis, W. 1915. A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *J. Biol. Chem.* **22**, 305-308.
- Funk, C. D., Funk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S. and Fitzgerald, G. A. 1991. Human platelet/ erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* **5**, 2304-2312.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. and Aruoma, O. I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 601-617.
- Ham, H. M., Woo, K. S., Lee, B. W., Park, J. Y., Sim, E. Y., Kim, B. J., Lee, C. W., Kim, S. J., Kim, W. H., Lee, J. S. and Lee, Y. Y. 2015. Antioxidant compounds and activities of methanolic extracts from oat cultivars. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1660-1665.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572-584.
- Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on super-oxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.
- Jung, S. J., Lee, J. H., Song, H. N., Seong, N. S., Lee, S. E. and Baek, N. I. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *Appl. Biol. Chem.* **47**, 135-140.
- Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H. and Lee, B. H. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 337-342.
- Kim, K. J., Park, S. E., Lee, J. H. and Choi, Y. H. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory effects of phenolic rich *Hylotelephium erythrostictum* extracts. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 842-848.
- Lee, G. W., Park, S. M., Yoo, Y. C. and Cho, Y. H. 2013. Effect of *Ponciri fructus* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* on the collagen synthesis and expression of matrix metalloproteinase-1. *KSBB J.* **28**, 1-9.
- Li, C. C., Hsiang, C. Y., Lo, H. Y., Pai, F. T., Wu, S. L. and Ho, T. Y. 2012. Genipin inhibits lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation in mice as evidenced by nuclear factor-kappa B bioluminescent imaging-guided transcriptomic analysis. *Food Chem. Toxicol.* **5**, 2978-2986.
- Li, Y., Wu, Q., Deng, Y., Lv, H., Qiu, J., Chi, G. and Feng, H. 2015. D(-)-Salicin inhibits the LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells and mouse models. *Int. Immunopharmacol.* **26**, 286-289.
- Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Ross, R. P. and Stanton, C. 2017. Lactic acid bacteria and Bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Front. Microbiol.* **8**, 846-857.
- Marriott, J. B., Westby, M., Cookson, S., Guckian, M., Goodbourn, S., Muller, G., Shire, M. G., Stirling, D. and Dalgleish, A. G. 1988. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF- α production. *J. Immunol.* **161**, 4236-4243.
- Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampeietro, A. R. and Vatuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 109-114.
- Nishikimi, M. 1975. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 463-468.
- Oh, J. W., Lee, J. H., Cho, M. L., Shin, G. H., Kim, J. M., Choi, S. I., Jung, T. D., Kim, Y. H., Lee, S. J., Lee, B. J., Park, S. J. and Lee, O. H. 2015. Development and validation of analytical method for pectolinarin and pecto-

- linarinigenin in fermented *Cirsium setidens* Nakai by bio-conversion. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 1504-1509.
24. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* **44**, 307-315.
25. Poojary, M. M., Dellarosa, N., Roohinejad, S., Koubaa, M., Tylewicz, U., Gómez-Galindo, F., Saraiva, J. A., Rosa, M. D. and Barba, F. J. 2017. Influence of innovative processing on γ -aminobutyric acid (GABA) contents in plant food materials. *Compr. Rev. Food Sci. Saf.* **16**, 895-905.
26. Rabha, D. J., Singh, T. U., Rungsung, S., Kumar, T., Parida, S., Lingaraju, M. C., Paul, A., Sahoo, M. and Kumar, D. 2018. Kaempferol attenuates acute lung injury in caecal ligation and puncture model of sepsis in mice. *Exp. Lung Res.* **44**, 63-78.
27. Raman, M., Chen, W. and Cobb, M. H. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-3112.
28. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
29. Shen, J., Cheng, J., Zhu, S., Zhao, J., Ye, Q., Xu, Y., Dong, H. and Zheng, X. 2019. Regulating effect of baicalin on IKK/IKB/NF- κ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis. *Int. Immunopharmacol.* **73**, 193-200.
30. Urabe, K., Aroca, P., Tsukamoto K., Mascagna, D., Paulumbo, A., Prota, G. and Vincent J, H. 1994. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochem. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1221**, 272-278.
31. Waltenberger, B., Halabalaki, M., Schwaiger, S., Adamopoulos, N., Allouche, N., Fiebich, B. L., Hermans, N., JansenDürr, P., Kesternich, V., Pieters, L., Schönbichler, S., Skaltsounis, A. L., Tran, H., Trougakos, I. P., Viljoen, A., Wolfender, J. L., Wolfrum, C., Xynos, N. and Stuppner, H. 2018. Novel natural products for healthy ageing from the mediterranean diet and food plants of other global sources-The MediHealth Project. *Molecules* **23**, 1097-1113.
32. Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T. and Huez, G. 1996. Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J. Inflamm.* **46**, 1-12.
33. Xie, C., Kang, J., Li, Z., Schauss, A. G., Badger, T. M., Nagarajan, S., Wu, T. and Wu, X. 2012. The acaiflavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF-kappa B activation and MAPK pathway. *J. Nutr. Biochem.* **3**, 1184-1191.
34. Yoo, K. M., Kim, D. O. and Lee, C. Y. 2007. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 177-182.
35. Yoon, H. J., Moon, M. E., Park, H. S., Im, S. Y. and Kim, Y. H. 2007. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW264.7 macrophage cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 954-959.

초록 : LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 찹쌀떡버섯 균사체로 생물전환된 루모라고사리 추출물의 항염증 효과

홍지혜¹ · 장은서¹ · 길명철² · 이계원^{1*} · 조영호^{1*}

(¹건양대학교 제약생명공학과, ²주)플루토 기술연구소)

본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 생물전환 루모라고사리 추출물(B-RAE)의 항염증 효과 및 작용기전을 연구하였다. B-RAE의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과 379.26±7.77 mg/g과 50.85±3.08 mg/g으로 각각 나타났다. B-RAE의 항산화효과를 측정된 결과 DPPH, ABTS, superoxide anion radical을 농도의존적으로 소거하는 것으로 확인되었다. 또한, B-RAE는 세포생존에 영향을 미치지 않으면서 NO 생성을 처리 농도의존적으로 저해하였다. 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 발현에 미치는 영향을 정량적 실시간 PCR로 측정된 결과 전염증성 사이토카인의 mRNA 발현량을 LPS 처리군과 비교하여 B-RAE 처리 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타났다. 염증 관련 단백질(iNOS, COX-2)의 발현 및 전사인자인 NF- κ B와 MAPK 신호경로 단백질의 인산화에 미치는 영향을 Western blot 분석으로 평가하였다. 그 결과 LPS 처리에 의하여 증가된 iNOS와 COX-2의 발현을 유의적으로 억제하였다. 또한, LPS 처리에 의하여 증가된 NF- κ B와 I κ B의 인산화가 B-RAE 처리에 의하여 감소되는 것으로 나타났다. MAPK 신호경로 단백질의 인산화에 미치는 영향을 측정된 결과 ERK와 p38 MAPK 단백질의 인산화는 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났으나 JNK의 인산화는 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 B-RAE의 항염증 효과는 높은 항산화 활성, iNOS와 COX-2 발현 억제를 통한 NO 생성 억제, NF- κ B 경로 저해, MAPK 신호경로 조절 및 전염증성 사이토카인 발현 저해에 의해 가능하다는 것을 제시한다.