Food Sci. Preserv., 31(2), 315-323 (2024)
pISSN: 3022-5477, eISSN: 3022-5485

Food Science and Preservation
https://doi.org/10.11002/fsp.2024.31.2.315

Research Article

Anti-inflammatory effect in macrophages according to the mixing ratio of acemannan and aloesin

Acemannan과 aloesin의 혼합 비율에 따른 대식세포에서의 항염증 효과

Hyo-Min Kim[1], Jeong-Hwan Kim[2], Dan-Hee Yoo[2], Se-Yeong Jeon[3], Hyun-Jin Kim[3], Seon-Gil Do[3], In-Chul Lee[4], Jung-Wook Kang[2]*

김효민[1] · 김정환[2] · 유단희[2] · 전세영[3] · 김현진[3] · 도선길[3] · 이인철[4] · 강정욱[2]*

[1]*College of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea*
[2]*College of Fusion and Convergence, Seowon University, Cheongju 28674, Korea*
[3]*Naturetech Co., Ltd. Jincheon 27858, Korea*
[4]*Department of Bio-Cosmetic Science, Seowon University, Cheongju 28674, Korea*

[1]*경북대학교 약학대학, [2]서원대학교 융복합대학, [3]㈜네이처텍, [4]서원대학교 바이오코스메틱학과*

Abstract This study aims to confirm the anti-inflammatory activities of acemannan and aloesin, which have been studied for various efficacies at various mixed sample ratios. The mixed samples were mixed at a ratio of 1:1 (AA-1), 1:2 (AA-2), 1:3 (AA-3), 2:1 (AA-4), and 3:1 (AA-5). Seven samples were evaluated for their cytotoxic ability on macrophages, and the results showed that all cell viability was over 90% at a concentration of 100 μg/mL. First, due to the NO production inhibitory activity, a better inhibitory effect was achieved when using a mixed sample rather than a single material. Afterward, the activity of inhibiting the production of PGE_2, TNF-α, and IL-6 was confirmed using a mixed sample. It was confirmed that AA-2 had the best inhibitory activity on producing PGE_2, TNF-α, and IL-6 rather than AA-1, AA-3, AA-4, and AA-5. For this reason, experiments were conducted using AA-2 to determine the protein expression levels of iNOS and COX-2, which are inflammation-related proteins. It was confirmed that AA-2 inhibited iNOS and COX-2 protein expression by 25.01% and 27.27%, respectively, compared to the LPS-alone treatment group. In conclusion, the mixed sample of acemannan and aloesin is judged to have anti-inflammatory activity and can potentially to be used as a functional material.

Keywords anti-inflammatory, acemannan, aloesin, functional material

OPEN ACCESS

Citation: Kim HM, Kim JH, Yoo DH, Jeon SY, Kim HJ, Do SG, Lee IC, Kang JW. Anti-inflammatory effect in macrophages according to the mixing ratio of acemannan and aloesin. Food Sci. Preserv., 31(2), 315-323 (2024)

Received: December 28, 2023
Revised: February 21, 2024
Accepted: February 21, 2024

***Corresponding author**
Jung-Wook Kang
Tel: +82-43-299-8519
E-mail: jwkkang@seowon.ac.kr

Copyright © 2024 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

신체 내의 방어 작용인 염증 반응은 미생물 감염, 화학적 자극 등 유해한 외부 물질과 병리학적 자극에 의해 발생한다(Kalaiselvan과 Rasool, 2016). 염증 원인이 제거되지 않고 염증 매개체들에 과도하게 노출될 경우, 시간이 지나면서 세포 손상, 조직 괴사, 심지어 암과 같은 만성질환으로 이어질 수 있다(Lee 등, 2012). 면역 방어 세포인 대식세포는 염증 과정에서 가장 핵심적인 역할을 한다. 특히, 대표적인 염증 자극 물질로는 lipopolysaccharide (LPS)가 알려져 있으며, 이는 대식세포와 같은 다양한 면역 세포를 활성화시킨다(Sun 등, 2021). 자극받은 면역 세포들은 nuclear transcription factor E_2 related factor 2/heme oxygenase-1, mitogen-activated protein kinases 및 nuclear factor- kappa B와 같은 염증 신호 전달 경로를 활성화시켜 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2

(COX-2)와 같은 염증 유발 효소뿐만 아니라 interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E_2 (PGE_2) 등의 염증 인자를 생성한다(Ci 등, 2010; Peng 등, 2015). 염증 유발 효소인 iNOS는 건강한 신체에서의 정상적인 조건이 아닌 LPS와 같은 자극물질에 의해 유도되어 발현이 일어난다. 이러한 iNOS는 다량의 NO를 발생시킴으로써 생체 내에서 건강한 세포와 조직을 손상시켜 염증을 악화시킨다고 알려져 있다(Forstermann과 Sessa, 2012; Sakai 등, 2006). 또한, PGE_2 생성과 연관이 있는 COX-2는 signaling cascade 촉발, 촉매적 활성 증가 등으로 인해 급성적인 발현이 유도되어 PGE_2를 다량으로 생성한다(Hong 등, 2021). 다량으로 생성된 PGE_2는 혈관 신생 유도 및 세포 사멸 억제 작용으로 인해 종양 성장에 기여하며, 통각 수용체를 감작시켜 신체를 염증 상태로 만드는 원인이라고 알려져 있다(Kang, 2012; Kim 등, 2007). 이러한 염증 매개체 유전자들의 발현으로 인한 염증성 매개 인자들의 생성을 조절하는 것을 핵심 타겟으로 하여 항염증제 개발이 활발히 진행되고 있다(Park 등, 2012).

알로에는 북아프리카, 중동 아시아, 남부 지중해 등의 덥고 건조한 지역에서 많이 분포되어 있으며, 약 500개의 종류가 존재한다. 이 중 알로에 아보레센스(*Aloe arboresences*), 알로에 베라(*Aloe vera*), 알로에 사포나리아(*Aloe saponaria*), 알로에 페록스(*Aloe ferox*)가 대표적이다. 알로에의 효능으로는 변비 개선 및 예방, 항산화, 항암, 항진균, 항고지혈증, 항당뇨병 등이 보고된다(Kim 등, 2022; Sanchez 등, 2020). 또한, acemannan 다당체와 anthraquinones류인 aloesin, aloin, aloenin, aloeemodin 등이 함유되어 있으며, 이 외에도 비타민, 아미노산, 토코페롤, 지방산, 미네랄 등의 성분들이 함유된 것으로 알려져 있다(Derouiche 등, 2023; Ro 등, 2020). 알로에의 주요 성분 중 하나인 acemannan은 알로에의 acetylated mannose에서 주성분인 다당체를 분리한 성분으로, 의료 및 산업 분야에서 많은 약리학적, 생물학적으로 다양한 연구가 진행되었다(Gonzalez-Delgado 등, 2023). 이는 구강 질환, 심혈관 질환, 종양 질환, 대사 질환 등의 효능뿐만 아니라, 대식세포에서 전염증성 사이토카인 분비에 대한 면역 조절 효과를 가진 것으로 알려져 있다(Darzi 등, 2021; Tavakoli 등, 2023).

Aloesin은 알로에 식물에서 유래된 천연 폴리페놀 성분으로 신체에 강력한 항산화 작용을 하며, 화상 치유, 면역 조절, 항균뿐만 아니라 멜라닌 생성에 직접적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한, 색소 침착 억제 효과와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway에 대한 저해 효과로 인한 항염증 활성을 나타내어 다양한 생물학적 효능을 가진 것으로 알려져 있다(Dini와 Laneri, 2021; Saeedi 등, 2021; Tornero-Martinez 등, 2022). 이로 인해 acemannan과 aloesin은 각각 다양한 효능을 가지고 있으며, 두 성분의 공통 효능으로는 신체 내에서 항염증 활성을 갖고 있는 것을 알 수 있다. 하지만 aloesin은 비용이 높은 단점을 갖고 있어(Jeon 등, 2022), aloesin에 비해 비용이 저렴한 acemannan을 혼합하게 되면 경제적인 장점을 높일 수 있다.

본 연구에서는 알로에의 주요 성분인 acemannan과 aloesin의 각각의 효능과 혼합 비율에 따른 항염증 활성을 규명하여 최적의 비율을 탐색하고, 기능성 소재로써 활용 가능성을 검증하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 추출

본 실험에 사용된 물질인 acemannan과 aloesin은 ㈜네이처텍(Jincheon-gun, Chungcheongbuk-do, Korea)에서 공급받아 실험을 진행하였다. Acemannan은 알로에 베라(*Aloe vera*) 잎의 외피를 제거한 후 셀룰로오스 효소 처리하여 여과한 상등액을 활성탄 여과 및 농축 건조시켜 제조하였다. Aloesin은 알로에 페록스(*Aloe ferox*) 잎을 열수 추출 후 냉각 침지하여 얻어진 침전물을 columm chromatography를 통하여 고순도의 aloesin을 제조하였다. 시료는 단일물질인 acemannan과 aloesin, acemannan과 aloesin을 1:1 (AA-1), 1:2 (AA-2), 1:3 (AA-3), 2:1 (AA-4), 3:1 (AA-5)의 비율로 혼합한 시료 5종을 사용하여 실험을 진행하였다.

2.2. 시약 및 기기

세포 배양은 fetal bovine serum (FBS), dulbecco modified eagle medium (DMEM), 100 U/mL penicillin/streptomycin을 Thermo Scientific Hyclone (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성을 측정하기 위해 사용된 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이후 세포 실험에 사용된 LPS, Griess reagent 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며, PGE_2 생성량과 전염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6 생성량 측정을 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하였고, 이는 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. 염증 매개 물질의 단백질 발현을 확인하기 위해 iNOS 및 anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody은 Cell signaling (Danvers, MA, USA)을 사용하였고 β-actin, COX-2 및 anti-mouse (m-IgGκ BP-HRP)는 Santa cruz biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)에서 구입하였다. 단백질 발현을 위한 시약인 immobilon western chemiluminescent HRP substrate는 Merck millipore (Burlington, MA, USA)에서 구입하여 enhanced chemiluminescence (ECL)로 사용하였다.

https://doi.org/10.11002/fsp.2024.31.2.315

실험에 사용한 기기는 pH meter (STARA2110, Thermo Scientific), CO_2 incubator (MCO-18AC, Pantasonic Healthcare Co., Kadomashi, Osaka, Japan), micro refrigerated centrifuge (Smart R17, Hanil Scientific Inc., Gimpo, Gyeonggi-do, Korea), microplate reader (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Allmendgrun, Ortenberg, Germany), chemidoc imaging system (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) 등을 사용하였다.

2.3. 세포 배양

본 실험에 사용된 대식세포는 한국세포주은행(KCLB40071)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM 배지에 FBS는 10%, 100 U/mL penicillin/streptomycin은 1%의 비율로 조제하여 세포 배양 시 배지로 사용하였다. 배양 조건은 5% CO_2 incubator에서 37℃로 설정하였으며, 계대배양은 18시간 이상 배양한 후 진행하였다.

2.4. MTT assay

대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성을 확인하기 위해 Carmichael 등의 방법(Carmichael 등, 1987)을 이용하여 실험을 진행하였다. 세포를 일정하게 배양하기 위해 cell counting 후 96 well plate에 1×10^4 cells/well을 분주하여 배양하였다. 이후 acemannan, aloesin 및 각 비율대로 제조한 시료들을 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 μg/mL의 농도로 첨가하였다. 시료가 첨가된 배양액과 함께 24시간 동안 배양한 후, 2.5 mg/mL의 농도인 MTT 시약을 각 well에 40 μL씩 첨가하여 3시간 30분 배양하였다. 이후 상등액을 모두 제거하고, DMSO 100 μL씩 첨가하여 shaking을 10분간 진행한 뒤 microplate reader를 이용해 540 nm로 흡광도를 설정하여 측정하였다.

2.5. NO 생성 저해 활성 측정

NO 생성 저해 활성은 RAW 264.7 세포를 이용하여 Green 등의 방법(Green 등, 1982)을 통해 실험을 진행하였다. 6 well plate에 RAW 264.7 세포를 3×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 각 well이 10 μg/mL의 LPS 농도를 가지도록 배양액 내에 처리하였다. LPS 처리 2시간 후 희석된 시료들을 100 μg/mL 농도로 처리하여 18시간 배양한 뒤 96 well plate에 배양액 100 μL와 griess 시약 100 μL를 혼합하여 10분간 반응시킨다. 그 후, microplate reader를 이용해 흡광도 540 nm에서 측정을 진행하였다.

2.6. PGE_2 생성 저해 활성 측정

RAW 264.7 세포를 3×10^5 cells/well로 6 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 24시간 후 각 well에 LPS를 10 μg/mL의 농도가 되도록 처리하여 2시간 동안 반응시켰다. 염증 유도를 시킨 후 각 시료를 첨가하여 18시간 동안 배양하였으며, 배양이 완료된 배양액 800 μL를 침전물을 제거하기 위해 16,305 ×*g*에서 5분간 원심분리를 진행하였다. 원심분리 후 상층액 500 μL를 수거하여 PGE_2의 함량을 측정하였다. 이는 ELISA kit를 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 실험을 진행하였다. PGE_2 함량 측정은 microplate reader를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

2.7. 전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6) 생성량 측정

염증 매개 cytokine인 TNF-α, IL-6의 생성량을 측정하기 위해 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 실험을 진행하였다. 6 well plate에 세포를 3×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포에 자극제인 LPS를 10 μg/mL의 농도로 처리하여 2시간 동안 반응시킨 후 각 시료를 농도별로 첨가하였다. 18시간 후, 배양액을 수거하여 5분간 16,305 ×*g*로 원심분리를 진행한 상등액을 실험에 사용하였다. TNF-α와 IL-6의 생성량은 각각의 ELISA kit를 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 실험을 진행하였다. TNF-α와 IL-6 함량 측정은 microplate reader를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

2.8. Western blot을 통한 단백질 발현 측정

염증 매개 인자인 iNOS, COX-2 단백질 발현을 확인하기 위해 LPS로 RAW 264.7 세포의 염증을 유도하여 western blot을 진행하였다. 먼저, 100 mm cell culture dish에 RAW 264.7 세포(1×10^6 cells/well)를 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. 안정화된 세포를 확인한 뒤 자극제인 LPS를 10 μg/mL 농도로 각 well에 처리하여 2시간 동안 반응시켜 염증을 유도하였다. 2시간 후 각 시료들을 독성이 없는 구간인 10, 50, 100 μg/mL 농도로 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 세포의 배양액을 제거하여 PBS로 2회 세척하고 lysis buffer (RIPA buffer와 protease & phosphatase single-use inhibitor cocktail 100X를 혼합한 용액)를 이용하여 세포를 용해시켰다. 용해된 세포는 20분간 원심분리(4℃, 16,305 ×*g*)하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액은 BCA protein assay kit로 정량을 진행하였으며, 이후 10%의 acrylamide gel로 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 membrane (polyvinylidene fluoride)에 transfer한 뒤 skim milk를 tris-buffered saline & tween 20 (TBST)로 용해하여 5% skim milk를 제조하였으며, 이를 이용해 1시간 동안 blocking하였다. 이후 1차 항체를 3% skim milk에 희석하여 4℃에서 overnight을 진행하여 반응한 다음 TBST로 10분간 3회 membrane 세척을 진행하였다. 세척한 membrane에 2차 항체를 첨가하여 1시간 30분 동안 반응시

킨 후 제거하여 TBST로 10분간 3회 세척을 진행하였다. 그다음 ECL용액으로 membrane의 단백질을 반응시켜 chemidoc imaging system으로 결과를 확인하였다.

2.9. 통계 분석

모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실시한 데이터를 분석하였으며, 각 항목의 평균치±표준편차(standard division, SD)를 표기하였다. 결과의 유의성 검증을 위해 IBM SPSS Statistics (23, IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 일원분산분석 (one-way ANOVA) 및 사후검정으로 Duncan's multiple range test ($p<0.05$)와 t-test ($p<0.001$)를 실시하여 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. MTT assay에 의한 세포 생존율

담황색의 기질인 MTT는 세포 내 미토콘드리아에서 호흡연쇄 효소로 인한 환원 반응이 일어나 formazan을 형성한다. 암적색인 formazan은 죽은 세포에서는 생성이 일어나지 않고, 살아있는 세포 내에서만 생성이 일어나며, 550 nm 근처에서 최대의 흡광도가 발생한다(Yoo와 Lee, 2020).

대식세포인 RAW 264.7 세포에서의 acemannan, aloesin 및 혼합 시료인 AA-1, AA-2, AA-3, AA-4, AA-5의 세포 생존율을 MTT assay를 이용하여 확인하였다(Fig. 1). Acemannan, aloesin 및 AA-1-5는 5-1,000 μg/mL의 농도로 처리하여 실험하였으며, 그 결과, 100 μg/mL 농도에서 모든 시료는 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 따라서 이후 항염증 활성 관련 세포 실험은 세포 생존율이 90% 이상인 100 μg/mL 농도로 설정하여 실험을 진행하였다.

3.2. NO 생성 저해 활성

염증 반응은 선천성 면역 반응으로 생체 방어 기작 중 가장 먼저 발생하는 면역 반응이라고 알려져 있어, 면역과 염증은 서로 밀접한 관계를 가지고 있는 것을 알 수 있다. 결과적으로 선천성 면역 반응 중 가장 대표적인 물질 중 하나인 NO는 혈액응고, 혈압 조절, 암세포 관련 면역 반응 등 다양한 기능을 가지고 있지만, 과도하게 생성될 경우 세포 손상으로 인한 다양한 질환들의 원인으로 작용한다고 알려져 있다(Lee와 Ji, 2023).

Acemannan, aloesin 및 혼합 시료인 AA-1, AA-2, AA-3, AA-4, AA-5의 NO 생성 저해 활성을 확인하고자 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포를 이용하였다. 먼저, LPS 단독 처리군과 무처리군에 대한 차이를 확인하였으며, 각 시료의 NO 생성 저해 활성 측정 결과, 100 μg/mL 농도에서 acemannan과 aloesin은 각각 13.68%, 10.95%의 저해 효과가 나타났으며, AA-1은 25.89%, AA-2는 16.61%, AA-3는 21.85%, AA-4는 30.51%, AA-5는 21.33%의 저해 효과를 확인하였다(Fig. 2). 이는 acemannan과 aloesin을 혼합하였을 때 NO 생성 저해 효과가 더 높게 나타나는 것을 확인하여 단독으로 사용하기보다 혼합하였을 때 상승효과가 있는 것을 확인하였다. 이후 최적의 혼합 비율을 찾기 위해 PGE_2, TNF-α 및 IL-6 생성량 실험을 추가적으로 진행하였다.

3.3. PGE_2 생성 저해 활성

염증 반응을 유도하는 중요 인자 중 PGE_2는 국소적으로 활성화되며, arachidonic acid에 의해 COX가 작용하여 합성되어지는 물질이다. 이는 angiogenesis 촉진으로 인한 암 발생과 통증, 부종 및 홍반 등의 염증반응에 동반되는 질환들을 유발한다 (Jeong 등, 2012; Sun 등, 2020).

RAW 264.7 세포에 LPS 처리를 통해 증가된 PGE_2 생성량

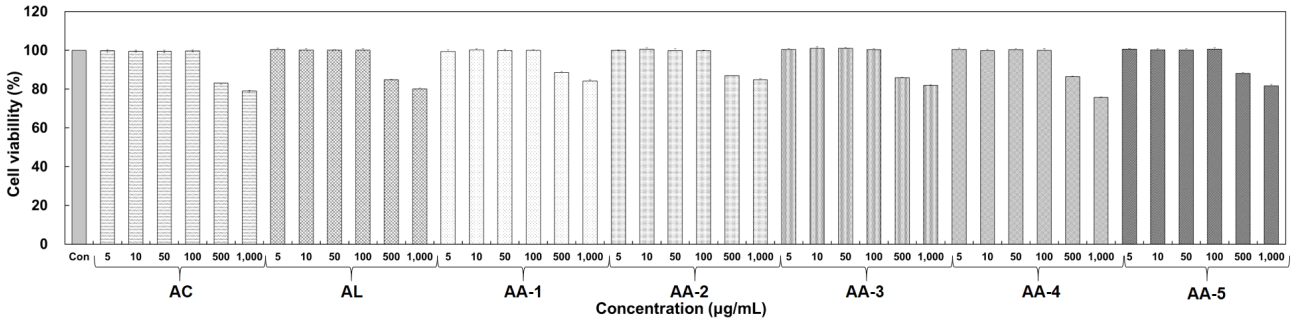

Fig. 1. Cell viability results of samples according to mixing ratio for RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were seeded in a 96-well plates at 1×10^4 cells/well for 24 h. Five types of samples mixed with acemannan and aloesin were treated and cultured for 24 h, and cell viability was measured using the MTT assay. AC, acemannan; AL, aloesin; AA-1, the ratio of acemannan to aloesin was 1:1; AA-2, the ratio of acemannan to aloesin was 1:2; AA-3, the ratio of acemannan to aloesin was 1:3; AA-4, the ratio of acemannan to aloesin was 2:1; AA-5, the ratio of acemannan to aloesin was 3:1. All values are mean±SD (n=3).

https://doi.org/10.11002/fsp.2024.31.2.315

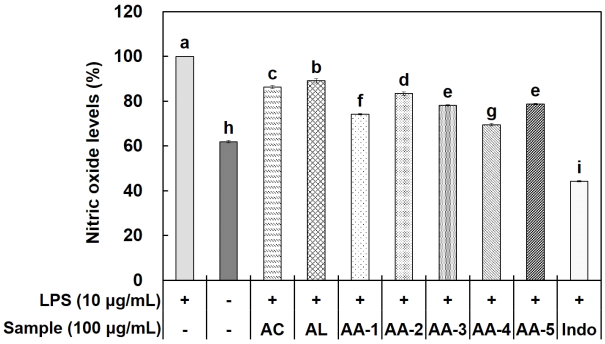

Fig. 2. **Inhibitory effect of samples according to the mixing ratio on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were distributed at 3×10^5 cells/well in a 6 well plates and stabilized for 24 h. Afterwards, LPS (10 μg/mL) was treated and reacted for 2 h, and then 5 types of samples with different mixing ratios of acemannan and aloesin were treated and reacted for 16 h. AC, acemannan; AL, aloesin; AA-1, the ratio of acemannan to aloesin was 1:1; AA-2, the ratio of acemannan to aloesin was 1:2; AA-3, the ratio of acemannan to aloesin was 1:3; AA-4, the ratio of acemannan to aloesin was 2:1; AA-5, the ratio of acemannan to aloesin was 3:1; Indo, indomethacin. All values are mean±SD (n=3). Different superscripts ($^{a-i}$) on the bars indicate significant differences among treatments at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

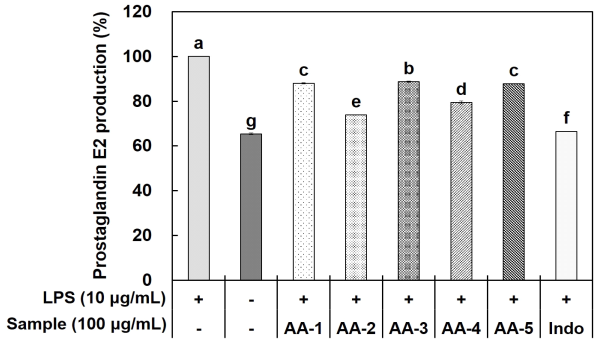

Fig. 3. **Inhibition effect on PGE_2 production of samples according to the mixing ratio in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were distributed at 3×10^5 cells/well in a 6 well plates and cultured with DMEM for 24 h. Afterwards, LPS (10 μg/mL) was treated for 2 h, and then 5 types of samples with different mixing ratios of acemannan and aloesin were treated and cultured for 16 h. PGE_2 production was measured by collecting the supernatant. AA-1, the ratio of acemannan to aloesin was 1:1; AA-2, the ratio of acemannan to aloesin was 1:2; AA-3, the ratio of acemannan to aloesin was 1:3; AA-4, the ratio of acemannan to aloesin was 2:1; AA-5, the ratio of acemannan to aloesin was 3:1; Indo, indomethacin. All values are mean±SD (n=3). Different superscripts ($^{a-i}$) on the bars indicate significant differences among treatments at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

을 acemannan과 aloesin을 혼합한 시료인 AA-1, AA-2, AA-3, AA-4, AA-5 처리 후 억제 효능을 확인하였다(Fig. 3). PGE_2 생성 저해 활성 측정 결과, 100 μg/mL 농도에서 AA-1은 11.97%, AA-2는 26.11%, AA-3는 11.34%, AA-4는 20.53%, AA-5는 12.21% 저해 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

3.4. 전염증성 cytokine (TNF-α, IL-6) 생성량

Pro-inflammatory cytokines으로 알려진 TNF-α, IL-6, IL-1β 등은 염증 조절 인자로서 염증 반응에 관여한다고 알려져 있다. TNF-α, IL-6, IL-1β는 면역계를 자극하여 만성 염증 유발 cytokine으로서 종양 형성 등에 관여한다고 알려져 있으며, 이러한 cytokine이 과다하게 생성될 경우 패혈성 쇼크 및 염증성 질환 등을 유발한다(Kim, 2017; Park 등, 2018).

Acemannan과 aloesin을 혼합한 시료인 AA-1, AA-2, AA-3, AA-4, AA-5에 대한 TNF-α 및 IL-6의 생성량 저해 활성을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이, TNF-α 생성량은 100 μg/mL 농도에서 AA-1은 18.13%, AA-2는 26.77%, AA-3는 5.97%, AA-4는 9.79%, AA-5는 2.58%의 저해 효과를 보이는 것을 확인하였다. IL-6 생성량은 100 μg/mL 농도에서 AA-1은 12.66%, AA-2는 27.33%, AA-3는 13.42%, AA-4는 12.84%, AA-5는 5.05%의 저해 효과를 나타내었다.

TNF-α와 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine은 과발현이 일어나게 되었을 때, 염증 관련 유전자인 iNOS와 COX-2의 생성을 유도하여 NO와 PGE_2 등의 염증 매개체를 생성한다(Kim 등, 2021). 하지만 NO 생성 저해 활성에서 AA-2가 AA-4에 비해 낮은 저해 활성을 보였지만, 염증 발생에 관여하는 PGE_2, TNF-α 및 IL-6의 저해 활성에서 더 높은 활성을 나타내어, 본 연구에서는 AA-2를 선택하여 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현량에 대한 실험을 진행하였다. 추후 다른 혼합 비율에 대한 항염증 활성도 추가적인 연구를 진행하여 항염증 활성 메커니즘을 확립하고자 한다.

3.5. Western blot을 통한 단백질 발현

염증 반응에 관여하는 효소인 iNOS와 COX-2는 염증 반응에서 NO와 PGE_2의 생성을 조절하는 데 관여한다. 대표적으로 염증 자극에 의해 유도되는 단백질인 iNOS는 과도한 NO 생성과 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 조직 손상, 신경 손상 및 유전자 변이 등이 일어나 염증을 심화시킨다고 알려져 있다. 또한, 염증 반응 부위에서 발현되는 COX-2는 apoptosis 억제 및 세포 증식을 촉진하여 암뿐만 아니라, 다양한 염증성, 퇴행성 질환을 발생시키는 데 중요한 역할을 한다. 이러한 염증 반응으로 인해 발생한 iNOS 및 COX-2의 발현을 조절하는 것은 항염증 반응에 관여한다는 것을 알 수 있다(Lee 등, 2010; Lee 등,

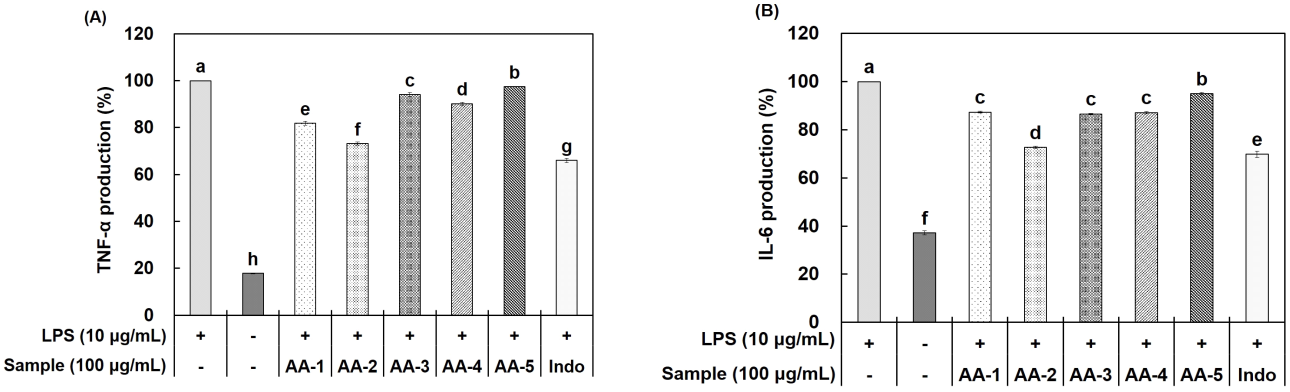

Fig. 4. Inhibitory effects on TNF-α and IL-6 of samples with different mixing ratios in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were distributed at 3×10^5 cells/well, stabilized for 24 h, and then stimulated by treatment with LPS (10 μg/mL). Afterwards, 5 types of samples with different mixing ratios of acemannan and aloesin were added and incubated for 16 h. The supernatant was collected and the production amounts of TNF-α and IL-6 were measured. (A) Effect of TNF-α inhibitory activity according to mixing ratio of acemannan and aloesin. (B) Effect of IL-6 inhibitory activity according to mixing ratio of acemannan and aloesin. AA-1, the ratio of acemannan to aloesin was 1:1; AA-2, the ratio of acemannan to aloesin was 1:2; AA-3, the ratio of acemannan to aloesin was 1:3; AA-4, the ratio of acemannan to aloesin was 2:1; AA-5, the ratio of acemannan to aloesin was 3:1; Indo, indomethacin. All values are mean±SD (n=3). Different superscripts ($^{a-f}$) on the bars indicate significant differences among treatments at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

2017; Namkoong 등, 2015).

Acemannan과 aloesin을 혼합한 시료 중 PGE_2 생성 저해 활성, TNF-α 및 IL-6의 생성량 저해 활성이 가장 우수한 AA-2의 iNOS, COX-2 단백질 발현량에 미치는 영향을 확인하였다 (Fig. 5). AA-2는 10, 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하였으며, 최종 농도인 100 μg/mL 농도에서 AA-2에 의한 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 저해 효과는 각각 25.01%, 27.27%가 나타나는 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 acemannan과 aloesin

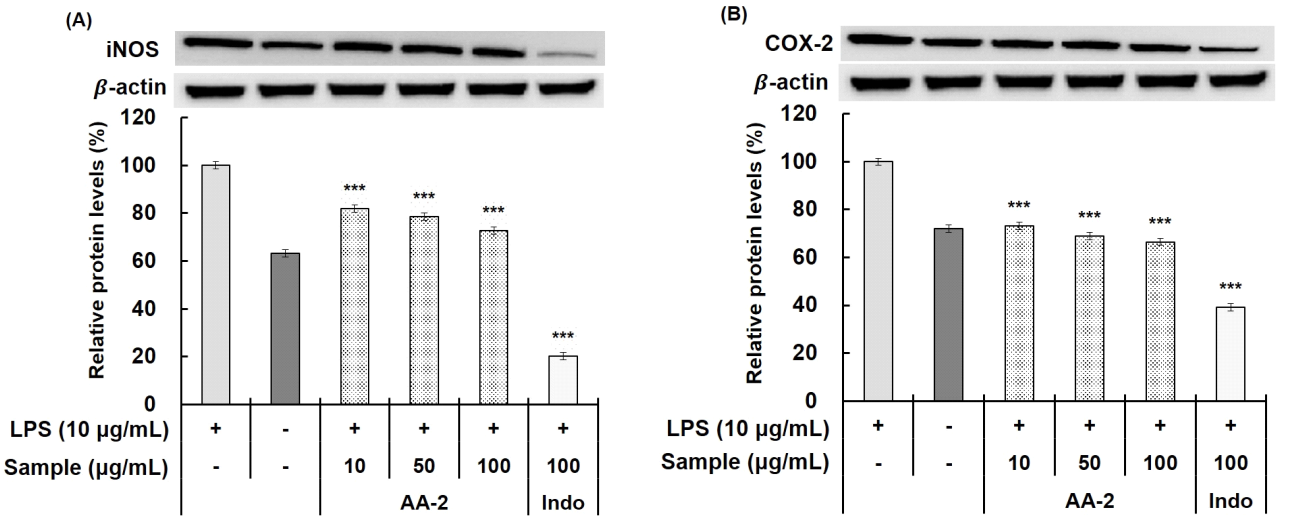

Fig. 5. Inhibitory effects on iNOS and COX-2 protein expression of samples in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. RAW 264.7 cells were seeded at 1×10^6 cells/well and cultured for 24 h. LPS (10 μg/mL) was reacted for 2 h, and 5 samples with different mixing ratios of acemannan and aloesin were treated and incubated for 16 h. Afterwards, proteins were extracted from the cells, and protein expression of iNOS and COX-2 was measured using western blot. (A) When acemannan and aloesin are in a 1:2 ratio, iNOS protein expression level inhibitory activity effect. (B) When acemannan and aloesin are in a 1:2 ratio, COX-2 protein expression level inhibitory activity effect. AA-2, the ratio of acemannan to aloesin was 1:2; Indo, indomethacin. All values are mean±SD (n=3) (Compared to the LPS alone treatment group. $^{***}p<0.001$).

https://doi.org/10.11002/fsp.2024.31.2.315

이 혼합된 추출물은 염증 발생에 관여하는 NO, PGE_2, pro-inflammatory cytokine의 생성량을 저해하는 활성을 통해 항염증 소재로써 활용 가능성이 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 추가적인 염증 기전 검증 및 *in vivo* 연구 등을 통해 기능성 소재로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 요약

현재 항염증 활성에 대한 효능이 검증된 acemannan과 aloesin을 다양한 비율로 혼합하여 비율에 따른 항염증 효능을 확인하고자 본 연구를 진행하였다. 항염증 활성은 NO, PGE_2, TNF-α 및 IL-6 생성량 및 염증 관련 단백질인 iNOS, COX-2의 발현량에 대한 효능을 검증하였다. Acemannan과 aloesin 각각의 NO 생성 저해 활성 결과와 혼합 시료인 AA-1, AA-2, AA-3, AA-4, AA-5의 NO 생성 저해 활성 결과를 비교하였을 때, 혼합 시료가 더 우수한 NO 생성 저해 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 이후 최적의 배합 비율을 찾기 위해 PGE_2, TNF-α 및 IL-6 생성량에 대해 측정하였다. 그 결과, 시료 5종 모두 최종 농도인 100 μg/mL 농도에서 LPS 단독 처리군 대비 저해 효과가 나타났으며, 이 중 AA-2의 저해 효과가 가장 높은 것을 확인하여 western blot을 통한 염증 관련 단백질 발현량은 AA-2를 이용하여 실험을 진행하였다. 염증 관련 단백질인 iNOS 및 COX-2의 발현량을 측정 결과, AA-2는 농도 의존적으로 감소하였으며, 최종 농도인 100 μg/mL 농도에서 LPS 단독 처리군 대비 각각 25% 이상의 억제 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 토대로 acemannan과 aloesin을 다양한 비율로 배합하였을 때, 항염증 활성을 가진 것을 확인하였으며, 이 중 acemannan과 aloesin이 1:2의 비율로 혼합되었을 때 가장 높은 항염증 활성을 나타내었다. 결론적으로 acemannan과 aloesin을 혼합한 시료는 다양한 기능성 소재로써 활용이 가능하며, 이후 항염증 활성 실험들의 기초자료로도 활용이 가능한 것을 확인하였다.

Funding

This project is the result of support from the Korea Industrial Complex Corporation's Industrial Cluster Competitiveness Enhancement Project (PCC22001).

Acknowledgements

None.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Kim JH, Kim HJ, Kang JW. Methodology: Kim HM, Kim JH, Yoo DH. Formal analysis: Kim HM, Jeon SY, Kim HJ. Validation: Yoo DH, Do SG, Lee IC. Writing - original draft: Kim HM, Yoo DH. Writing - review & editing: Kim HM, Kang JW.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Hyo-Min Kim (First author)
https://orcid.org/0000-0002-5528-1108
Jeong-Hwan Kim
https://orcid.org/0009-0007-7137-8851
Dan-Hee Yoo
https://orcid.org/0000-0002-6264-3904
Se-Yeong Jeon
https://orcid.org/0009-0005-4266-4010
Hyun-Jin Kim
https://orcid.org/0000-0002-2102-1850
Seon-Gil Do
https://orcid.org/0009-0001-8668-6271
In-Chul Lee
https://orcid.org/0000-0002-7314-9098
Jung-Wook Kang (Corresponding author)
https://orcid.org/0000-0002-0089-728X

References

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res, 47, 936-942 (1987)

Ci X, Ren R, Xu K, Li H, Yu Q, Song Y, Wang D, Li R, Deng X. Schisantherin A exhibits anti-inflammatory properties by down-regulating NF-kappaB and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. Inflammation, 33, 126-136 (2010)

Darzi S, Paul K, Leitan S, Werkmeister JA, Mukherjee S. Immunobiology and application of *Aloe vera*-based scaffolds in tissue engineering. Int J Mol Sci, 22, 1708 (2021)

Derouiche M, Mzabri I, Ouahhoud S, Dehmani I, Benabess R, Addi M, Hano C, Bourkroute A, Berrichi A, Kouddane N. The effect of salt stress on the growth and development of three *Aloe* species in eastern Morocco. Plant Stress, 9, 100187 (2023)

Dini I, Laneri S. The new challenge of green cosmetics: Natural food ingredients for cosmetic formulations. Molecules, 26, 3921 (2021)

Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. Eur Heart J, 33, 829-837 (2012)

Gonzalez-Delgado M, Minjares-Fuentes R, Mota-Ituarte M, Pedroza-Sandoval A, Comas-Serra F, Quezada-Rivera JJ, Saenz-Esqueda A, Femenia A. Joint water and salinity stresses increase the bioactive compounds of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel enhancing its related functional properties. Agric Water Manag, 285, 108374 (2023)

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem, 126, 131-138 (1982)

Hong H, Lee KM, Park T, Chi WJ, Kim SY. Anti-inflammatory effect of *Distylium racemosum* leaf biorenovate extract in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages cells. J Appl Biol Chem, 64, 375-382 (2021)

Jeon G, Ro HS, Kim GR, Lee HY. Enhancement of melanogenic inhibitory effects of the leaf skin extracts of *Aloe barbadensis* Miller by the fermentation process. Fermentation, 8, 580 (2022)

Jeong H, Sung M, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 888-894 (2012)

Kalaiselvan S, Rasool MK. Triphala herbal extract suppresses inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and adjuvant-induced arthritic rats via inhibition of NF-κB pathway. J Immunotoxicol, 13, 509-525 (2016)

Kang HW. Antioxidant and anti-inflammatory effect of extracts from flammulina velutipes (Curtis) singer. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 1072-1078 (2012)

Kim B, Choi CG, Kim JI, Kim HR. Anti-inflammatory effect of hexane fraction from *Eisenia bicyclis* on lipopolysaccharides-treated RAW 264.7 cells. Korean J Fish Aquat Sci, 54, 152-161 (2021)

Kim DM, Park HR, Lee HK, Kwon YS, Choi YM. Skin wrinkles improvement effect for Jeju *Aloe arborescens* oil isolated from supercritical fluid extraction. Asian J Beauty Cosmetol, 20, 427-437 (2022)

Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J, Seo EK, Lee KT. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. Biol Pharm Bull, 30, 2345-2351 (2007)

Kim SG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Ledum palustre* L. Korean J Food Preserv, 24, 1025-1033 (2017)

Lee HG, Ji JG. Evaluation of Anti-inflammatory and antioxidant abilities of complex extracts produced from *Leonurus japonicus* Houtt., *Houttuynia cordata* Thunberg, and *Citrus unshiu* Markovich. KOCS, 40, 35-47 (2023)

Lee HH, Park C, Kim MJ, Seo MJ, Choi SH, Jeong YK, Choi YH. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E2 production through down-regulation of NF-κB activity by the extracts of fermented beans. J Life Sci, 20, 388-395 (2010)

Lee SH, Jin KS, Kim BW, Kwon HJ. The anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Malus melliana* ethanol extract. J Life Sci, 27, 783-789 (2017)

Lee TH, Jung M, Bang MH, Chung DK, Kim J. Inhibitory effects of a spinasterol glycoside on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via down-regulating MAP kinase pathways and NF-κB activation in RAW 264.7 macrophage cells. Int Immunopharmacol, 13, 264-270 (2012)

Namkoong S, Jang SA, Sohn EH, Bak JP, Sohn E, Koo HJ, Yoon WJ, Kwon JE, Jeong YJ, Meng X, Han SH, Kang SC. Comparative study of *Litsea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. Korean J Plant Res, 28, 145-152 (2015)

Park SB, Song HM, Kim HN, Park GH, Son HJ, Um Y, Park JA, Jeong JB. Anti-inflammatory effect of Biji (soybean curd residue) on LPS-Stimulated RAW 264.7 cells. Korean J Plant Res, 31, 117-123 (2018)

Park SM, Byun SH, Kim YW, Cho IJ, Kim SC. Inhibitory effect of *Mori folium* ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. Kor J Herbology, 27, 31-38 (2012)

Peng XX, Zhang SH, Wang XL, Ye TJ, Li H, Yan XF, Wei L, Wu ZP, Hu J, Zou CP, Wang YH, Hu XD. *Panax notoginseng* flower saponins (PNFS) inhibit LPS-stimulated NO overproduction and iNOS gene overexpression via the suppression of TLR4-mediated MAPK/NF-kappa B signaling pathways in RAW264.7 macrophages. Chin Med, 10, 15 (2015)

Ro HS, Jang HJ, Kim GR, Park SJ, Lee HY. Enhancement of the anti-skin wrinkling effects of *Aloe arborescens* miller extracts associated with lactic acid fermentation. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2743594 (2020)

Saeedi M, Khezri K, Seyed Zakaryaei A, Mohammadamini H. A comprehensive review of the therapeutic potential of α-arbutin. Phytother Res, 35, 4136-4154 (2021)

Sakai K, Suzuki H, Oda H, Akaike T, Azuma Y, Murakami T, Sugi K, Ito T, Ichinose H, Koyasu S, Shirai M. Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxide synthesis in macrophage: Critical dimerization of inducible nitric-

 https://doi.org/10.11002/fsp.2024.31.2.315

oxide synthase. J Biol Chem, 281, 17736-17742 (2006)
Sanchez M, Gonzalez-Burgos E, Iglesias I, Gomez-Serranillos MP. Pharmacological update properties of *Aloe vera* and its major active constituents. Molecules, 25, 1324 (2020)
Sun LP, Shi FF, Zhang WW, Zhang ZH, Wang K. Antioxidant and anti-inflammatory activities of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) honey extract. Foods, 9, 1039 (2020)
Sun S, Zhang J, Li H, Du Y, Li S, Li A, Suo X, Wang Y, Sun Q. Anti-inflammatory activity of the water extract of *Chloranthus serratus* roots in LPS-stimulated RAW 264.7 cells mediated by the Nrf2/HO-1, MAPK and NF-κB signaling pathways. J Ethnopharmacol, 271, 113880 (2021)
Tavakoli M, Labbaf S, Mirhaj M, Salehi S, Seifalian AM, Firuzeh M. Natural polymers in wound healing: From academic studies to commercial products. J Appl Polym Sci, 140, e53910 (2023)
Tornero-Martinez A, del Carmen Silva-Lucero M, Sampedro EC, Ramon-Gallegos E, Perez-Cruz C, Perez-Grijalva B, Mora-Escobedo R. *Aloe vera* and fermented extracts exhibit an anti-inflammatory effect on human Glioblastoma/Astrocytoma U373 MG cells. Plant Foods Hum Nutr (Dordrecht), 77, 37-43 (2022)
Yoo DH, Lee JY. Anti-inflammatory activities verification of *Ambrosia trifida* L. extract in RAW 264.7 Cells. Microbiol Biotechnol Lett, 48, 79-89 (2020)