



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

RAW264.7 대식세포에서 nojirimycin과
1-deoxynojirimycin의 항염증 효과 및 기전
연구

濟州大學校 大學院

化學科

玄 秀 斌

2021年 2月



RAW264.7 대식세포에서
nojirimycin과 1-deoxynojirimycin의
항염증 효과 및 기전 연구

지도교수 현 창 구

현 수 빈

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2020년 12월

현수빈의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2020년 12월

Anti-inflammatory Effects and Its Mechanism of Nojirimycin and 1-Deoxynojirimycin in RAW264.7 Macrophages

Su Bin Hyun
(Supervised by professor Chang-Gu Hyun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Science

2020. 12.

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Nojirimycin (NJ) is a structure in which the oxygen of the ring is replaced with an NH group in the D-glucose structure, and 1-deoxynojirimycin (DNJ) is produced when NJ is dehydrated and reduced. NJ, which have similar structures to D-glucose, are powerful glucosidase inhibitors and are interesting compounds. However, no anti-inflammatory effect has been reported. Therefore, in order to investigate anti-inflammatory effect, the production and expression of inflammatory cytokines as well as inflammatory mediators such as iNOS and COX-2 were measured in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In addition, the mechanisms of representative inflammatory signaling pathways, suppression of NF- κ B (nuclear factor- κ B) and MAPKs (mitogen activated protein kinase) activation were studied. The production of iNOS, COX-2, and inflammatory cytokines (PGE₂, IL-6, IL-1 β , TNF- α) according to NJ and DNJ treatment was significantly inhibited. In addition, DNJ showed anti-inflammatory effect by suppressing LPS-induced MAPKs activation, and NJ, DNJ showed anti-inflammatory effect by suppressing the translocation of NF- κ B through the prevention of I κ B α (inhibitory factor κ B α) phosphorylation. In addition, only NJ showed whitening effect, which is implied due to structural differences. Summarizing the above results, there is a possibility that NJ and DNJ can be used as anti-inflammatory agents, and it is implied that NJ can also be used as a whitening agent.

Key words: Nojirimycin, 1-Deoxynojirimycin, Anti-inflammation, Structural differences

목 차

ABSTRACT	1
목차	2
LIST OF FIGURES	4
I. 서 론	7
II. 재료 및 방법	9
1. 시료 및 시약	9
2. 실험방법	10
2.1. α -glucosidase inhibition activity	10
2.2. Tyrosinase inhibition activity	11
2.3. 세포배양	12
2.4. 세포 독성 평가	13
2.5. Nitric oxide (NO) 생성량 측정	14
2.6. PGE ₂ 및 염증성 cytokine 발현 측정	15
2.7. Western blot 실험	16
III. 결 과	17
1. nojirimycin의 항비만, 미백 효능 스크리닝 및 항염증 효과	17
1.1. α -glucosidase inhibition activity	17
1.2. Tyrosinase inhibition activity	19
1.3. 세포 독성 측정	21

1.4. Nitric oxide (NO) 및 PGE ₂ 생성량 측정	23
1.5. 전염증성 cytokine 발현 측정	25
1.6. iNOS, COX-2 발현량 측정	27
1.7. 단백질 발현 시간대 확인	29
1.8. MAPKs 발현량 측정	31
1.9. NF-κB 발현량 측정	33
1.10. Nojirimycin과 비슷한 구조의 효과	35
1.10.1. 세포 독성 측정	35
1.10.2. Nitric oxide (NO) 생성량 측정	37
2. 1-deoxynojirimycin의 항비만, 미백 효능 스크리닝 및 항염증 효과	39
2.1. α-glucosidase inhibition activity	39
2.2. Tyrosinase inhibition activity	41
2.3. 세포 독성 측정	43
2.4. Nitric oxide (NO) 및 PGE ₂ 생성량 측정	45
2.5. 전염증성 cytokine 발현 측정	47
2.6. iNOS, COX-2 발현량 측정	49
2.7. MAPKs 발현량 측정	51
2.8. NF-κB 발현량 측정	53
IV. 고찰	55
V. 참고문헌	57

LIST OF FIGURES

Figure 1. Mechanism of hydrolysis of p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p-NPG) by α -glucosidase.....	10
Figure 2. The simplified scheme of the melanin synthesis in melanocytes during melanogenesis.....	11
Figure 3. MTT reduction in live cells by mitochondrial reductase results in the formatio of insolub formazan, characterized by high absorptivity at 570 nm.....	13
Figure 4. The reaction of nitrite (NO_2^-) with Griess assay reagents forms an azo dye that is easily detected spectrophotometrically to extrapolate NO concentrations released from the sample.....	14
Figure 5. α -glucosidase Inhibition Activity of (a) acarbose and (b) NJ.....	18
Figure 6. Tyrosinase Inhibition Activity of (a) arbutin and (b) NJ.....	20
Figure 7. Effect of nojirimycin (NJ) on cell viability in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells.....	22
Figure 8. Effect of nojirimycin (NJ) on (a) nitric oxide and (b) PGE_2 production in LPS-induced RAW264.7 macrophages.....	24
Figure 9. Effect of nojirimycin (NJ) on LPS-induced (a) IL-6, (b) TNF- α and (c) IL-1 β production in macrophages.....	26
Figure 10. Effect of nojirimycin (NJ) on the level of iNOS, COX-2 protein in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells.....	28
Figure 11. Time course experiments to monitor protein levels of cell cycle regulatory molecules after LPS treatment.....	30

Figure 12. Effect of nojiimycin (NJ) on activations of ERK 1/2, JNK 1/2 and p38 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells.....32

Figure 13. Effect of nojirimycin (NJ) on phosphorylation of IκB-α, and IκB-α, phosphorylation of p65 and p105 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells.....34

Figure 14. Effect of (a) nojiimycin (NJ) and (b) D-glucose on cell viability in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells.....36

Figure 15. Effect of (a) nojirimycin (NJ) and (b) D-glucose on nitric oxide production in LPS-induced RAW264.7 macrophages.....38

Figure 16. α-glucosidase Inhibition Activity of (a) acarbose and (b) 1-deoxynojirimycin (DNJ).....40

Figure 17. Tyrosinase Inhibition Activity of (a) arbutin and (b) 1-deoxynojirimycin (DNJ)42

Figure 18. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on cell viability in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells.....44

Figure 19. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on (a) nitric oxide and (b) PGE₂ production in LPS-induced RAW264.7 macrophages.....46

Figure 20. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on LPS-induced (a) IL-6, (b) TNF-α and (c) IL-1β production in macrophages.....48

Figure 21. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on the level of iNOS, COX-2 protein in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells.....50

Figure 22. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on activations of ERK 1/2, JNK 1/2 and p38 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells.....52

Figure 23. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on phosphorylation of Iκ

B-α, and IκB-α, phosphorylation of p65 and p105 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells.....54

Figure 24. Structures of (a) nojirimycin, (b) 1-deoxynojirimycin and (c) D-glucose.....56

I. 서 론

염증은 인체에 발생하는 흔한 질환 중의 하나로 세균감염과 같은 외부자극으로부터 인체를 방어하는 중요한 기전이다 [1]. 염증반응은 감염으로부터 몸을 보호해주는 보호기전으로 작용하여 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할을 한다. 하지만 만성염증반응은 오히려 인간에게 질병을 일으키는 원인이 된다. 현대 사회의 급격한 산업 발달로 인해 생활환경 및 식생활의 변화 그리고 이에 따른 스트레스가 증가로 만성 염증 질환이 증가하고 있다. 또한 다양한 요인으로 인한 면역 조절 이상으로 유발된 염증이 지속되고 있다 [2]. 이로 인해, 현재 염증을 조절하고 그 기전을 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다 [3].

대식세포는 선천 면역을 담당하는 주요한 세포로 감염체에 대해 식작용을 나타내는 대표적인 백혈구이다 [4]. 그람 음성균의 외막인 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포를 자극하는 대표적인 염증 유발인자이다. 대식세포는 Toll-like receptor 4 (TLR4)를 통해 LPS를 인식하고, 이는 nitric oxide (NO)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , prostaglandinE2 (PGE₂)과 같은 사이토카인을 증가시킨다 [5]. 또한 이들은 mitogen activated protein kinase (MAPKs), nuclear factor of kappaB (NF- κ B) 기전에 의해 조절된다 [6].

MAPKs 신호전달경로는 염증 발생기전으로 잘 알려져 있다. ERK, JNK, p38로 구성되어있으며, 이들의 활성화는 인산화에 의해서 나타난다 [7]. MAPKs 신호전달은 평상시 세포의 증식, 분화 및 생존을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다. 하지만 외부자극에 의해 활성화되면 다양한 염증매개물질들의 생성을 유도함으로써 염증반응을 유발하는데 중요한 역할을 한다.

Nuclear factor of kappaB (NF- κ B) 신호전달경로 역시 MAPKs 신호전달경로와 마찬가지로 염증반응 발생에 중요하게 작용한다. NF- κ B는 평상시에는 세포질 내에서 저해단백질인 inhibitory kappa B- α (I κ B- α)와 복합체를 이루어 비활성화 상태로 존재한다 [8]. 하지만 LPS와 같은 외부자극이 주어지면 I κ B- α 는 인산화되고 유비퀴틴화되면서 복합체에서 분리된다. 분해된 NF- κ B 이합체는 자유

로이 활성화되어 세포질에서 핵으로 이동하게 된다 [9]. 이렇게 활성화된 NF- κ B는 염증성 사이토카인 및 iNOS, COX-2 와 같은 염증성 인자의 발현을 유도하게 된다. 따라서 항염증성 약물의 개발은 MAPKs와 NF- κ B 신호전달 경로의 활성을 억제하는 물질의 개발로도 그 의미를 확대할 수 있다.

Nojirimycin (NJ)은 자연에서 처음으로 *Streptomyces* 균주에서 발견되었다 [10]. NJ는 D-glucose 구조에서 고리의 산소가 NH 그룹으로 치환된 구조이다. 하지만 NJ는 강력한 glucosidase inhibitor로 생리학적 및 생화학적 연구를 위한 흥미로운 화합물이다 [11]. 또한, Nojirimycin (NJ)의 탈수 및 환원 반응을 통해 1-deoxynojirimycin (DNJ)이 만들어진다 [12]. DNJ 역시 강력한 glucosidase inhibitor이다.

최근 연구에 의하면 NJ는 기생 잡초에서 종자 발아를 선택적으로 억제함을 입증했다 [13]. 또한 DNJ는 지방 축적 [14] 및 종양 세포 전이를 억제 [15]하는데 중요한 역할을 하며, 노화방지 [16], 항 HIV [17] 과정에도 관여한다. 하지만 NJ와 DNJ의 항염증 활성화에 관련해서 보고된 연구는 없다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 마우스 대식세포를 이용하여 NJ와 DNJ의 항염증 활성화 및 그 작용기전에 대해 다양한 신호경로를 중심으로 연구하였다. 또한 NJ와 DNJ의 구조에서 구조적 차이에 따른 활성의 차이를 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

Nojirimycin, griess reagent, proteasome inhibitor cocktail, arbutin, acarbose, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), lipopolysaccharides (LPS)는 Sigma-Ardrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

1-Deoxynojirimycin은 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI ,USA)에서 구입하였다.

Dulbecco's Modified Eagle Medium, penicillin and streptomycin, fetal bovine serum (FBS), BCA protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-IkBa, IkBa, p-p65, p65, p-p105, p105, iNOS, COX-2, β -actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

RIPA buffer, dimethyl sulfoxide (DMSO), enhanced chemiluminescence (ECL) kit, 2X Laemmli sample buffer은 biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다.

2. 실험방법

2.1. α -glucosidase inhibition activity

Nojirimycin이 α -glucosidase 활성에 미치는 저해 활성을 측정하기 위해 Tibbot와 Skadsen의 방법을 변형하여 측정하였다 [19]. α -glucosidase는 전분과 이당류를 포도당으로 분해한다. 따라서 α -glucosidase 억제제는 당뇨병 치료제로 쓰이며, 항비만 효과를 가지고 있다. 기질과 효소가 만나면 *p*-nitrophenol이 만들어지며 이는 노란색을 띄고 있기 때문에 이를 흡광도를 특정하여 효능을 평가한다 (Figure 1).

α -glucosidase (0.2 units/mL, in 0.1 M PBS) 50 μ L 와 농도별 시료 20 μ L 를 넣고 37°C에서 5분 동안 전배양 한다. 5 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside 50 μ L를 넣고 37°C에서 25분 동안 반응시킨 후 반응을 종결시키기 위해 0.1 M sodium carbonate 100 μ L를 넣은 후 405 nm에서 microplate reader (Tecan sunrise, Austria)를 이용하여 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의해 저해율을 계산하였다. 각 반응은 3회 반복하여 측정하였다.

$$\text{Inhibition of } \alpha\text{-glucosidase activity (\%)} = \left[1 - \frac{B-D}{A-C}\right] \times 100$$

A: 시료 무처리군의 흡광도

B: 시료 처리군의 흡광도

C: 시료 무처리군에서 기질액을 처리하지 않은 군의 흡광도

D: 시료 처리군에서 기질액을 처리하지 않은 군의 흡광도

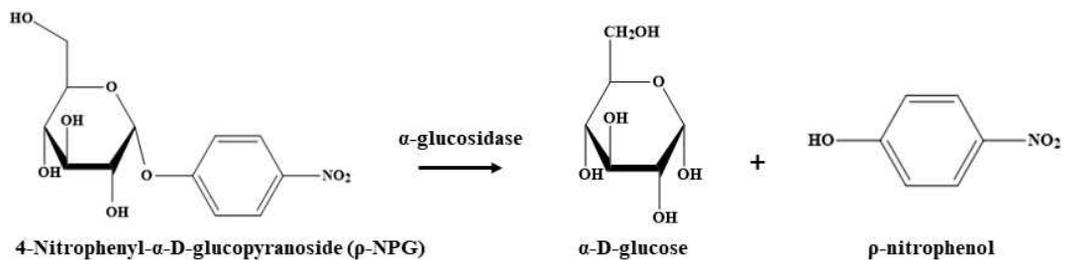


Figure 1. Mechanism of hydrolysis of *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p-NPG) by α -glucosidase.

2.2. Tyrosinase inhibition activity

균주 배양액이 tyrosinase 활성에 미치는 저해 활성을 측정하기 위해 Ishihara et.al. 방법을 변형하여 측정하였다 [18]. Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에 관여하며, 이를 저해하는 것은 미백제를 개발하는 방법 중 하나이다 (Figure 2).

0.1 M potassium phosphate buffer 45 μ L와 tyrosinase (2500 units/mL) 5 μ L와 농도별 시료액 20 μ L를 넣고 37°C에서 5분 동안 전배양한다. 2 mM L-tyrosine 70 μ L과 0.1 M potassium phosphate buffer 60 μ L를 넣고 37°C에서 25분 동안 반응시켜 480 nm에서 microplate reader (Tecan sunrise, Austria)를 이용하여 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의해 저해율을 계산하였다. 각 반응은 3회 반복하여 측정하였다.

$$\text{Inhibition of tyrosinase activity (\%)} = \left[1 - \frac{B - D}{A - C}\right] \times 100$$

A: 시료 무처리군의 흡광도

B: 시료 처리군의 흡광도

C: 시료 무처리군에서 기질액을 처리하지 않은 군의 흡광도

D: 시료 처리군에서 기질액을 처리하지 않은 군의 흡광도

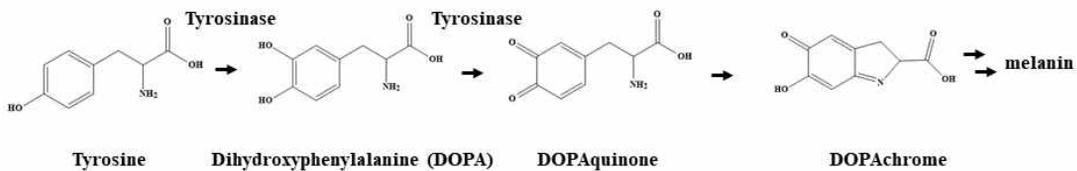


Figure 2. The simplified scheme of the melanin synthesis in melanocytes during melanogenesis.

2.3. 세포배양

실험에 사용된 마우스 대식 세포 RAW264.7은 한국세포주은행에서 분양받았다 (Seoul, Korea). 세포는 습도 100%, 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 배양하였으며, 10% heat-inactivation FBS와 1% penicillin 및 streptomycin를 함유한 DMEM 배지를 사용하였다. 배지는 2일마다 교환하였으며, 세포가 80% 이상 자랐을 때 cell scraper를 사용하여 계대배양 하였다.

2.4. 세포 독성 평가

세포 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT가 환원되는 방법을 이용하여 측정하였다 (Figure 3). 노란색의 수용성 MTT tetrazolium을 세포에 처리하면, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소효소에 의해 tetrazolium의 ring 구조가 끊어지면서 보라색을 띄는 비수용성의 MTT formazan 결정으로 환원된다.

세포를 배지에 현탁시킨 후 24-well plates (SPL, Korea)에 1.5×10^5 cells/well의 세포수가 되도록 500 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한다. 그 후 lipopolysaccharides (LPS; sigma, USA)와 샘플을 농도별로 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액 400 μ L를 첨가하여 배양기에서 4시간 동안 배양한 후, 상층액을 제거하였다. MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 잘 녹을 수 있게 DMSO를 넣어 녹인 후, microplate reader (Tecan sunrise, Austria)를 사용하여 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구했으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포 생존률을 측정하였다.

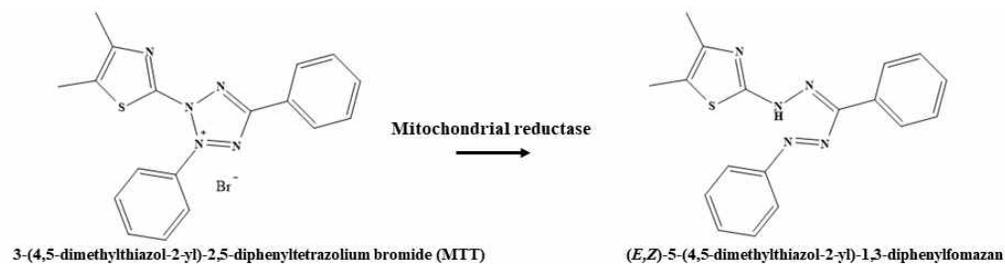


Figure 3. MTT reduction in live cells by mitochondrial reductase results in the formation of insoluble formazan, characterized by high absorptivity at 570 nm.

2.5. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

세포에서 농도별 항염증 효과를 측정하기 위해 세포 배양액에 존재하는 NO_2^- 형태로서 Griess reagent를 이용하여 측정하였다 (Figure 4). 24-well plates (SPL, Korea)에 1.5×10^5 cells/well의 세포수가 되도록 500 μL 씩 분주하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한다. 그 후 lipopolysaccharides (LPS; sigma, USA) 와 샘플을 농도별로 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양액 100 μL 와 griess reagent 100 μL 를 혼합하여 96-well plates (SPL, Korea)에서 10분 동안 반응시킨 다음, microplate reader (Tecan sunrise, Austria)를 사용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구했으며, LPS만 처리한 대조군의 흡광도 값과 비교하여 NO 생성량을 측정하였다.

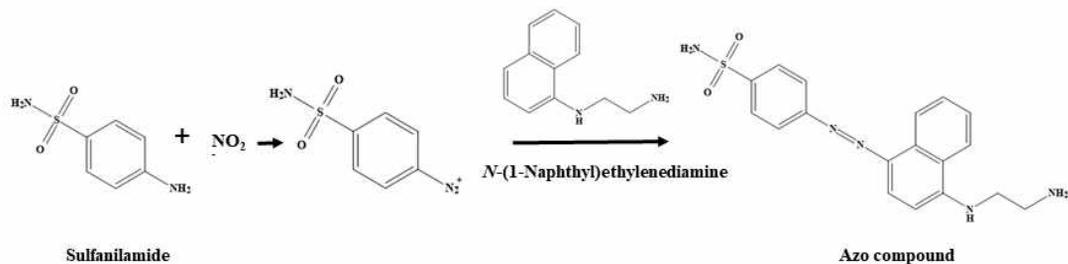


Figure 4. The reaction of nitrite (NO_2^-) with Griess assay reagents forms an azo dye that is easily detected spectrophotometrically to extrapolate NO concentrations released from the sample.

2.6. PGE₂ 및 염증성 cytokine 발현 측정

NO 측정과 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상층액을 회수하여 PGE₂ 및 염증성 사이토카인의 발현량을 측정하였다. Mouse IL-6 ELISA kit (BD bioscience, USA), mouse TNF- α ELISA kit (BD bioscience, USA), mouse IL-1 β ELISA kit (R&D systems, USA), mouse PGE₂ ELISA kit (BD bioscience, USA)를 사용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음, microplate reader (Tecan sunrise, Austria)로 흡광도를 측정하였다.

2.7. Western blot 실험

세포를 60 x 15 mm culture dish에 8×10^5 cells/dish의 세포수가 되도록 3 mL 씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 염증 관련 단백질의 발현량을 분석하기 위해 LPS와 Nojirimycin (NJ; 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM), 1-deoxynojirimycin (DNJ; 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 mM)를 동시에 처리하여 최소 15분에서 24시간까지 조건 별로 배양하였다. 배양 후 차가운 phosphate buffer saline (PBS; Biosesang, Korea)로 세척 후 RIPA lysis buffer (150 mM Sodium chloride, 1% TritonX-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail)를 첨가하여 단백질을 추출하였다. 15,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 이용하여 정량화하였다. 단백질 30 μ g를 laemmli sample buffer (Bio-rad, USA)에 넣고 100°C에서 3분 동안 불활성화 시킨 후 10% SDS-PAGE로 전기영동하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane (Bio-rad, USA)으로 transblotting 한 후, 5% skim milk 로 4시간 동안 blocking 시켰다. 1차 항체를 처리하여 상온에서 오버나잇 시킨 후, membrane을 Tris-buffered saline Tween-20 (TBST)로 6번 워시한 후 HRP-conjugate secondary antibody (1:5000 dilution)로 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. TBST 로 6번 워시한 후, 단백질은 Enhanced chemiluminescence (ECL; Biosesang, Korea)방법을 이용해 X-ray 필름으로 결과를 확인하였다.

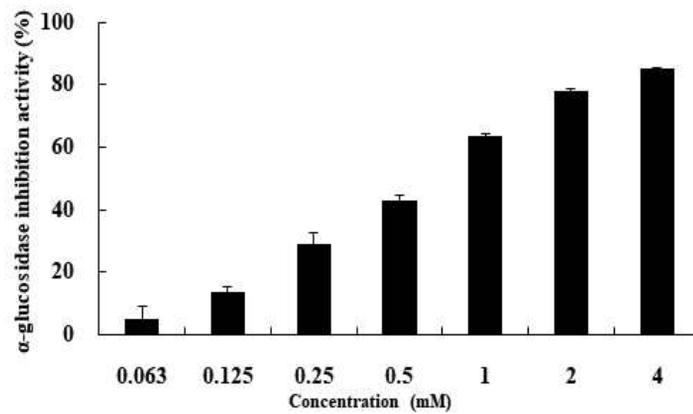
Ⅲ. 결과

1. nojirimycin의 항비만, 미백 효능 스크리닝 및 항염증 효과

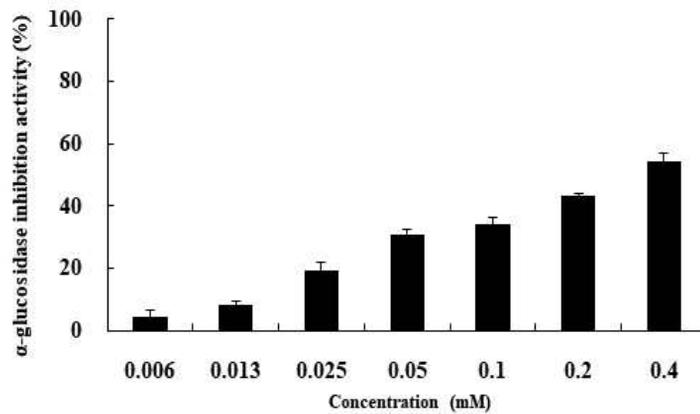
1.1. α -glucosidase inhibition activity

α -glucosidase는 섭취한 탄수화물을 단당류로 분해하는데 관여하는 효소이다. 이 효소 저해제로는 acarbose가 있으며, 이는 α -glucosidase를 저해하여 단당의 분해를 억제함으로써 당뇨병 환자의 식후 고혈당 증상을 방지할 수 있고, 비만치료제로도 쓰일 수 있다. 하지만 acarbose는 장기간 복용할 경우 구토, 설사를 비롯한 복부팽만감 등의 부작용이 뒤따를 수 있다. 따라서 부작용이 낮고, 식후 혈당 강하의 효능이 있는 소재에 관한 연구 필요성이 대두되고 있다.

본 실험에서는 NJ와 acarbose를 비교물질로 하여 α -glucosidase 저해 활성을 비교하였다 (**Figure 5**). 비교 물질로 사용한 acarbose 보다는 약 2배 정도 강한 저해 활성을 보이며 농도 의존적으로 억제했다. 향후 이 샘플의 활성 물질 동정을 통한 활성 기작에 대한 연구가 필요하며 본 연구 결과는 α -glucosidase의 저해 활성을 가지는 항비만 기능성 원료 발굴을 위한 기초자료로 활용가능하리라 사료된다.



(a)



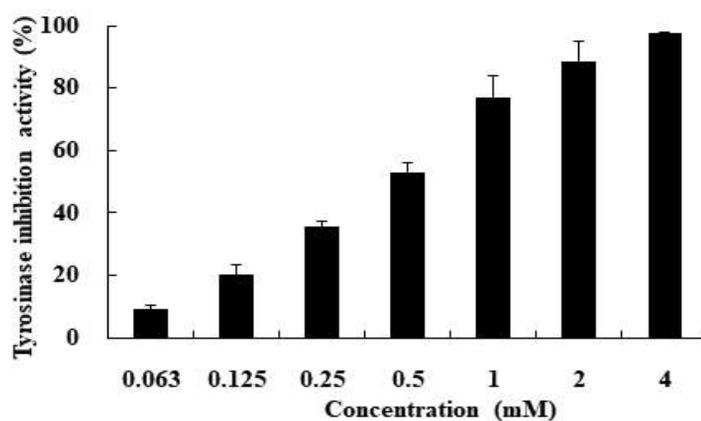
(b)

Figure 5. α -glucosidase Inhibition Activity of (a) acarbose ($IC_{50} = 0.62 \pm 0.015$ mM) and (b) NJ ($IC_{50} = 0.29 \pm 0.005$ mM). The data are expressed as mean \pm SD (n = 3).

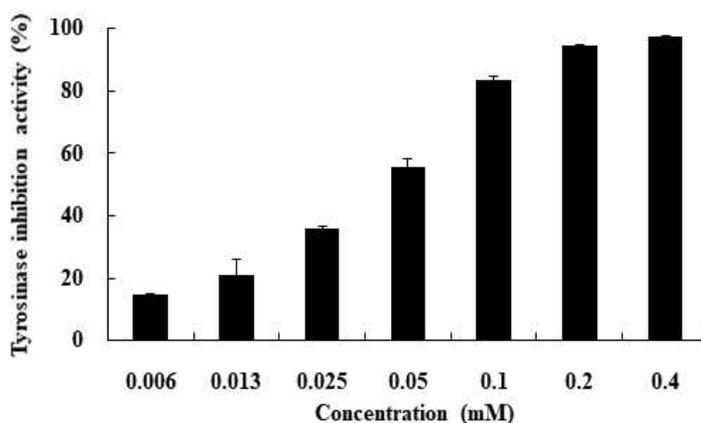
1.2. Tyrosinase inhibition activity

Tyrosinase는 피부 멜라닌 생성에 주효소로 작용한다. 이 효소는 생체 내에 존재하는 L-tyrosine이라는 아미노산을 기질로 하여 L-tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)로, 그리고 DOPA에서 DOPAquinone으로 산화되는 과정에 촉매로 작용한다. 이 두 번의 산화반응 후의 후속반응은 자발적으로 일어나기 때문에, tyrosinase가 관여하는 반응이 전체 반응 속도를 결정하게 된다. 이러한 이유로 tyrosinase 저해 활성은 미백 활성을 평가하는데 중요한 요소이다. 본 실험에서는 NJ와 대표적인 미백제로 알려져 있는 arbutin을 비교 물질로 하여 tyrosinase 저해 활성을 비교하였다 (**Figure 6**).

NJ는 비교 물질로 사용한 arbutin보다는 약 10배 정도 강한 저해 활성을 보이며 농도 의존적으로 억제했다. 향후 이 샘플의 활성 물질 동정을 통한 활성 기작에 대한 연구가 필요하며 본 연구 결과는 tyrosinase 저해 활성을 가지는 새로운 미백 기능성 원료 발굴을 위한 기초자료로 활용가능하리라 사료된다.



(a)



(b)

Figure 6. Tyrosinase Inhibition Activity of (a) arbutin ($IC_{50} = 0.44 \pm 0.013$ mM) and (b) nojirimycin (NJ) ($IC_{50} = 0.042 \pm 0.001$ mM). The inhibition of DOPA Chrome, a reaction product produced by tyrosinase, was confirmed by measuring absorbance. The data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

1.3. 세포 독성 측정

MTT assay를 이용하여 RAW264.7 대식세포에서 nojirimycin (NJ)의 세포독성을 확인하였다 (**Figure 7**). NJ를 농도별로 처리한 결과, 모든 농도에서 세포 생존률이 90% 이상을 나타내어 RAW264.7에 대해 독성을 나타내지 않았다. 따라서 추가적인 항염증 실험도 세포 생존률에 큰 영향을 미치지 않는 농도에서 진행하였다.

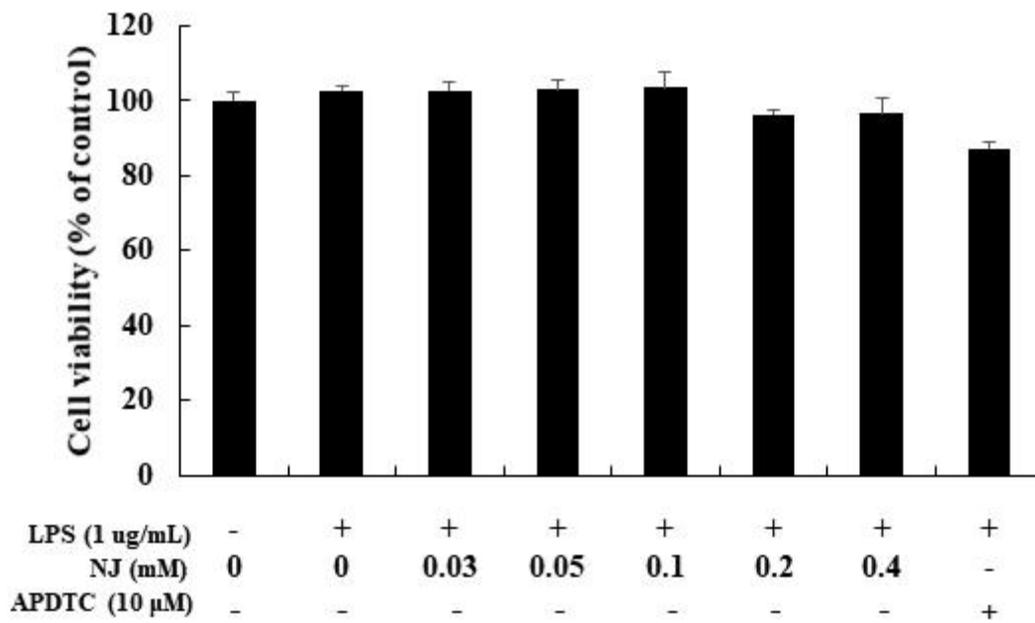
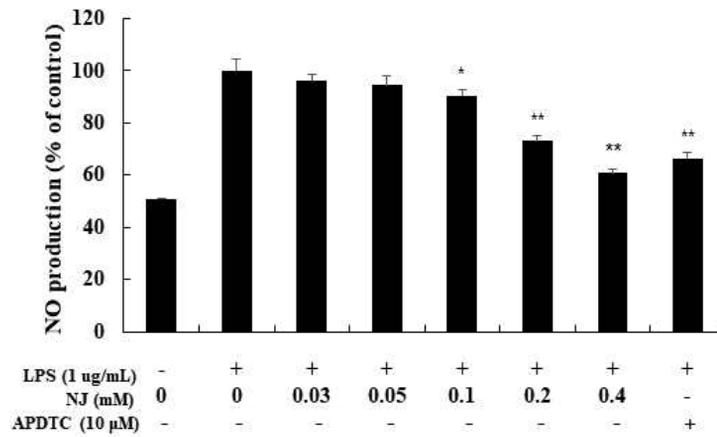


Figure 7. Effect of nojirimycin (NJ) on cell viability in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. Cells were each treated with nojirimycin (0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3).

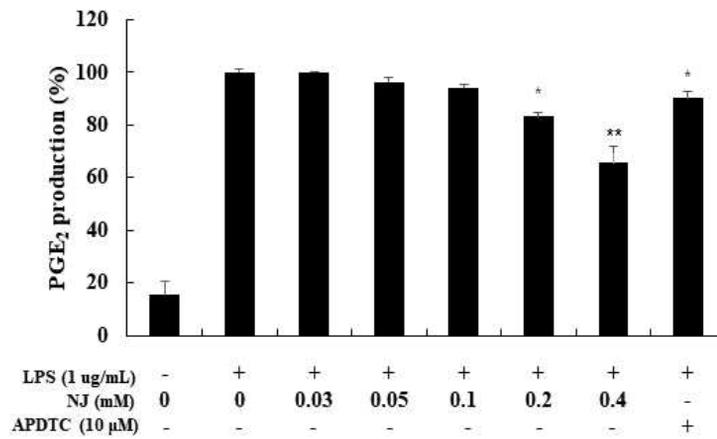
1.4. Nitric oxide (NO) 및 PGE₂ 생성량 측정

LPS 처리에 의한 RAW264.7 세포에서 NO 생성의 증가는 NJ 처리군에서 농도 의존적으로 감소되는 것으로 확인되었다 (**Figure 8**). NF- κ B inhibitor인 ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDTC)가 대조군으로 사용되었다. NJ의 농도가 0.4 mM에서 NO 생성을 약 39% 억제하였다. 또한, NJ가 고농도에서는 LPS를 처리하지 않는 정상군에 가까운 NO 생성량을 나타내어, 염증이 유도되었을 때 NJ의 처리가 효과적으로 NO 생성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

또한, NJ의 농도가 0.4 mM에서 PGE₂ 생성을 약 34% 억제하였다. 따라서 NJ로 NO 생성과 관련 있는 iNOS [20] 와 PGE₂ 생성과 관련이 있는 COX-2 [20], 대표적인 염증신호 전달 경로인 MAPKs, NF- κ B pathway [21]의 western blot 실험을 진행하였다.



(a)



(b)

Figure 8. Effect of nojirimycin (NJ) on (a) nitric oxide and (b) PGE₂ production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Cells were each treated with nojirimycin (0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

1.5. 전염증성 cytokine 발현 측정

전염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 는 염증반응을 매개하는 물질로 특히 초기 염증반응에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 [22]. NJ가 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7이 분비하는 염증성 사이토카인의 생성억제 효과를 측정하기 위해 ELISA 방법을 이용하였다. NJ는 염증이 유도된 RAW264.7에서 증가된 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다 (**Figure 9**). NJ의 농도가 0.4 mM에서 IL-6의 생성을 LPS 단독 처리군에 비해 약 76% 억제하였고, TNF- α 의 생성은 약 52%, IL-1 β 의 생성은 약 60% 억제하였다. IL-6의 생성에서 가장 높은 억제효과를 나타내었고, IL-6와 IL-1 β 의 생성량은 고농도에서는 LPS를 처리하지 않는 정상군에 가까운 생성량을 보이고 있다.

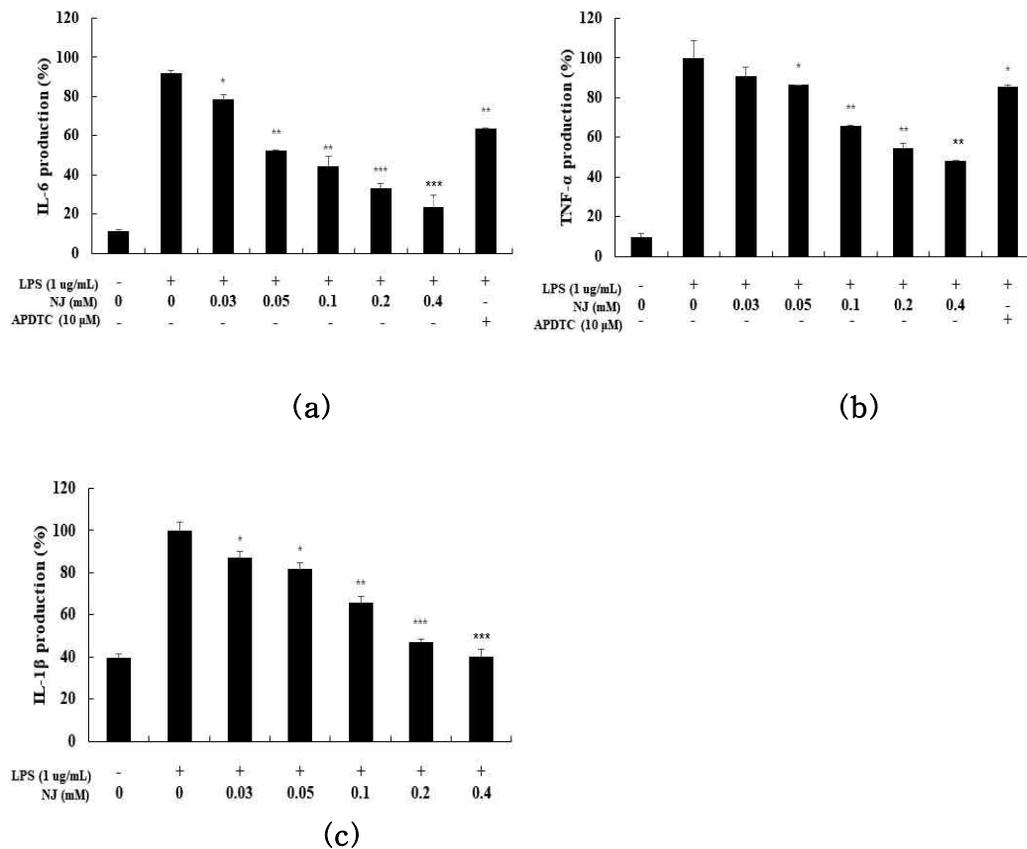


Figure 9. Effect of nojirimycin (NJ) on LPS-induced (a) IL-6, (b) TNF- α and (c) IL-1 β production in macrophages. RAW264.7 cells incubated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h in the presence or absence of nojirimycin (0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM). Culture supernatants were collected and analyzed for the presence of IL-6, TNF- α and IL-1 β using enzyme-linked immunosorbent assays. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

1.6. iNOS, COX-2 발현량 측정

NJ는 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7에서 효과적으로 NO와 PGE₂ 생성을 억제하였다. 이러한 NJ가 NO 생성과 관련이 있는 iNOS, PGE₂ 발현의 매개가 되는 COX-2 단백질 발현 억제에 영향을 끼치는지 확인하기 위해 western blot 실험 기법을 통해 확인하였다.

LPS 처리에 의한 iNOS, COX-2 생성의 증가는 NJ 처리군에서 농도 의존적을 감소되는 것으로 확인되었다 (**Figure 10**). RAW264.7 세포만 배양한 무처리군에서는 iNOS의 발현이 나타나지 않았으나 LPS만을 처리한 군에서는 iNOS의 발현이 무처리군에 비하여 현저히 증가하였다. iNOS 발현은 NJ의 농도가 0.4 mM일 때, 단백질의 발현이 대조군에 비해 약 46% 억제되었다. COX-2의 발현은 NJ의 농도가 0.4 mM일 때, 단백질의 발현이 대조군에 비해 약 74 % 억제되었다.

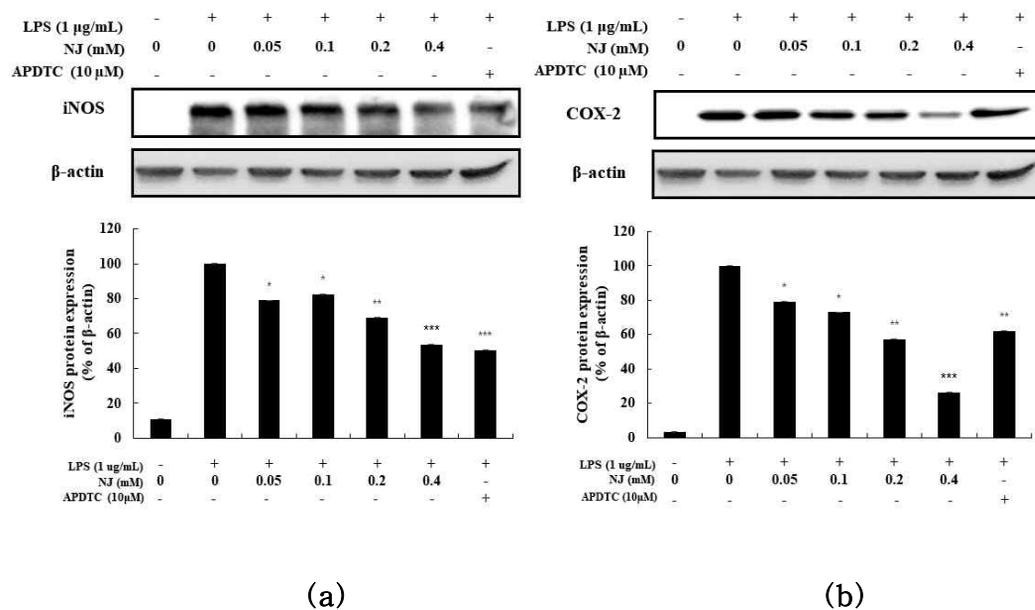


Figure 10. Effect of nojirimycin (NJ) on the level of iNOS, COX-2 protein in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells incubated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence or absence of NJ (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM). **(a)** iNOS protein level, **(b)** COX-2 protein level was validated by Image J. β-actin was used as an internal control. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

1.7. 단백질 발현 시간대 확인

기전 연구를 위해 MAPKs 및 NF- κ B 신호전달 경로의 단백질이 발현되는 시간대를 확인하기 위해 LPS를 시간대별로 처리하였다 (**Figure 11**). 그 결과 모든 단백질의 induction이 20분 동안 처리했을 때 가장 강했다. 따라서 western blot 실험을 진행할 때 sample과 LPS를 20분 동안 동시 처리하였다.

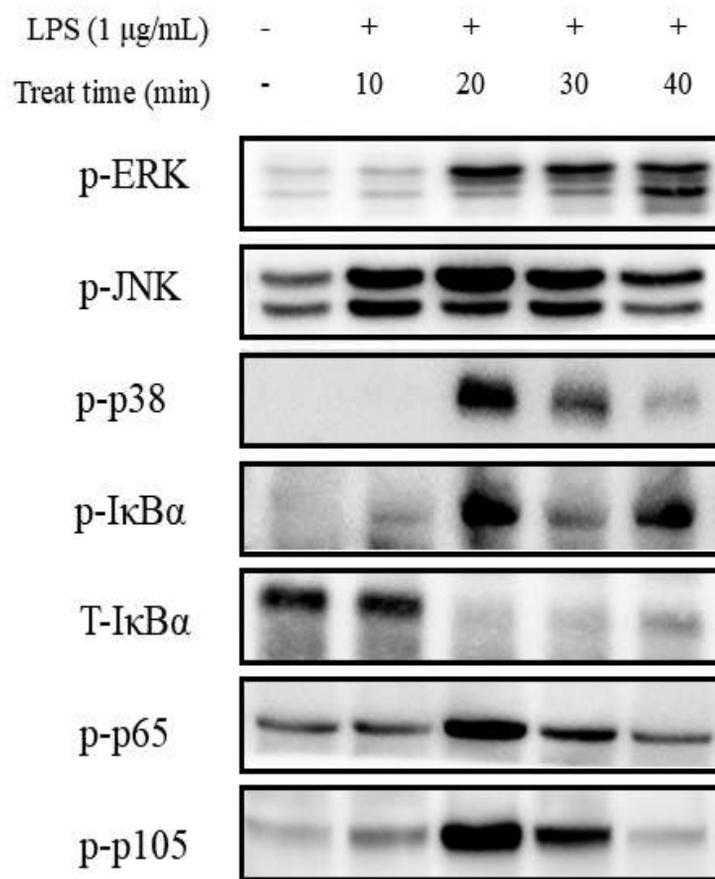


Figure 11. Time course experiments to monitor protein levels of cell cycle regulatory molecules after LPS treatment. RAW264.7 cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS for indicated time periods (0, 10, 20, 30, 40 min).

1.8. MAPKs 발현량 측정

MAPKs와 NF- κ B 경로는 면역세포에서 면역 활성을 매개하는 대표적인 신호 전달 체계이다. 이들은 외부 자극에 의해 면역반응이 매개되면서 면역세포 내부의 신호전달 체계가 활성화되어 NO, 사이토카인 등의 분비가 촉진된다 [23]. 대표적인 MAPKs의 단백질에는 ERK, JNK, p38 등이 있으며, 각 단백질의 인산화 유무에 따라 그 활성을 판단한다 [24]. 이에 NJ에 의한 효과의 분자적 기전을 조사하기 위하여 ERK, JNK, p38 단백질의 발현량을 살펴보았다 (**Figure 12**).

LPS 처리 시 ERK, JNK, p38의 인산화가 증가되었다. 하지만 NJ가 이들의 인산화 감소에 대해서 어떠한 경향성도 나타내지 않았다.

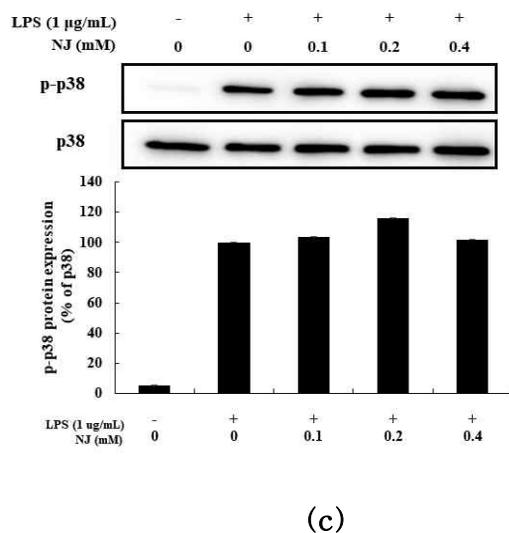
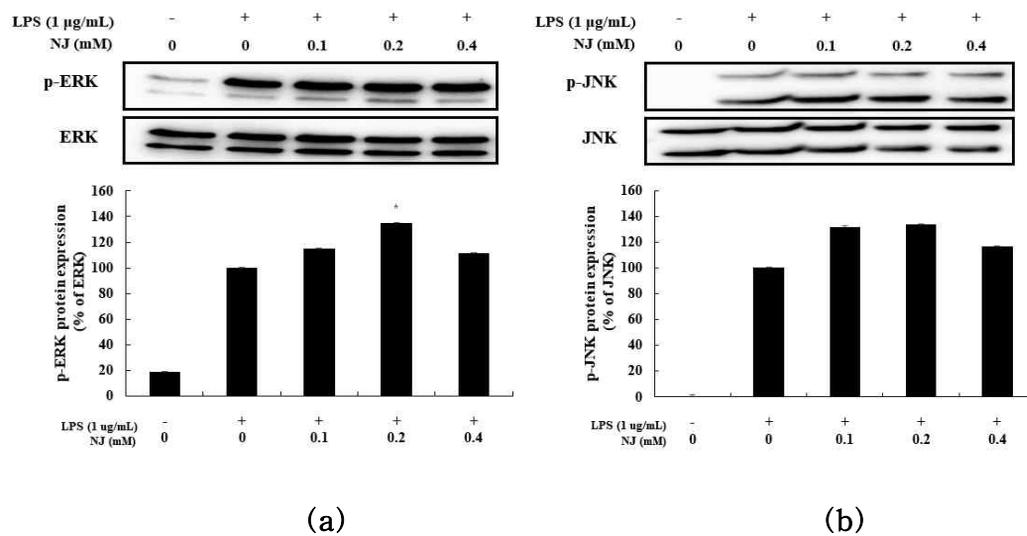


Figure 12. Effect of nojiimycin (NJ) on activations of ERK 1/2, JNK 1/2 and p38 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells incubated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 min in the presence or absence of NJ (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM). (a) ERK 1/2 protein level, (b) JNK 1/2 protein level, (c) p38 protein level was validated by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments ($n=3$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

1.9. NF- κ B 발현량 측정

Figure 13에 나타난 바와 같이, LPS 단독 처리군에서 I κ B- α 는 인산화되고 복합체에서 분리되었다. 하지만 NJ 처리군에서는 I κ B α 의 분해가 점차 억제되었고, 그에 따라 I κ B α 의 인산화도 억제되었다.

또한, p65와 p105의 활성화된 형태인 p-p65 및 p-p105의 발현은 LPS 처리 후 증가되었지만, NJ 처리에 의해 억제되었다. NJ의 농도가 0.4 mM에서 p-p65의 발현은 대조군에 비해 약 49% 억제되었고 p-p105의 발현은 약 14% 억제되었다.

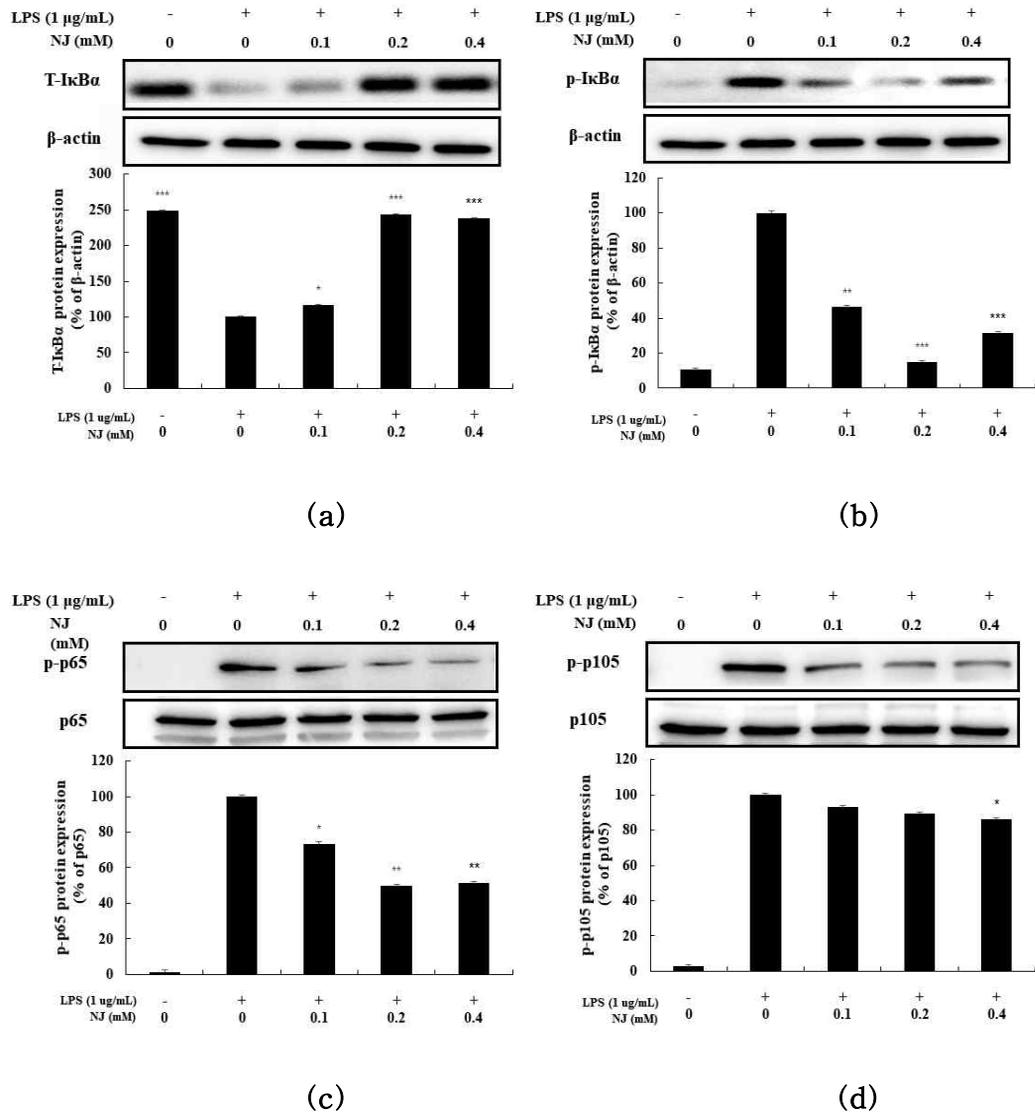
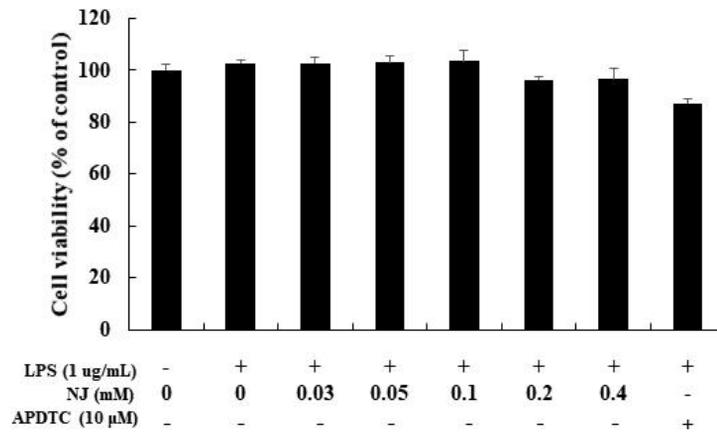


Figure 13. Effect of nojirimycin (NJ) on phosphorylation of IκB-α, and IκB-α, phosphorylation of p65 and p105 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells incubated with LPS (1 μg/mL) for 20 min in the presence or absence of NJ (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM). (a) IκB-α protein level, (b) p-IκB-α protein level, (c) p-p65 protein level, (d) p-p105 protein level was validated by Image J. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

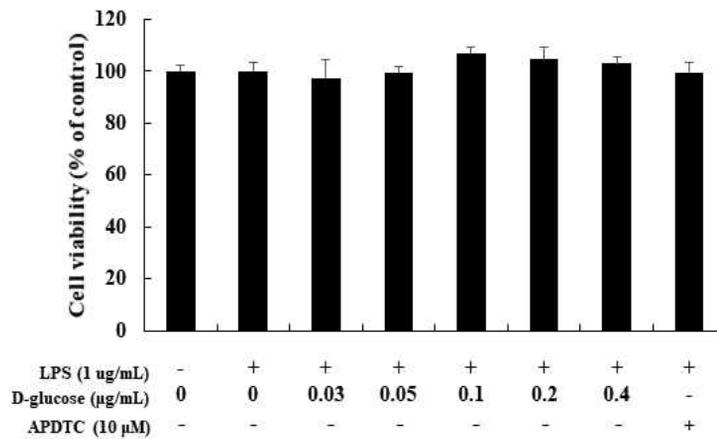
1.10. Nojirimycin과 비슷한 구조의 효과

1.10.1. 세포 독성 측정

MTT assay를 이용하여 RAW264.7 대식세포에서 nojirimycin (NJ)와 유사한 구조를 가진 D-glucose의 세포독성을 확인하였다 (**Figure 14**). NJ와 D-glucose를 농도별로 처리한 결과, 모든 농도에서 세포 생존률이 90% 이상을 나타내어 RAW264.7에 대해 독성을 나타내지 않았다. 따라서 추가적인 항염증 실험도 세포 생존률에 큰 영향을 미치지 않는 농도에서 진행하였다.



(a)

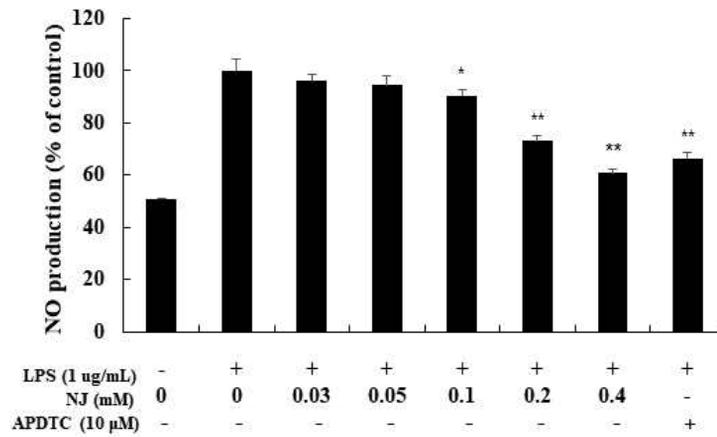


(b)

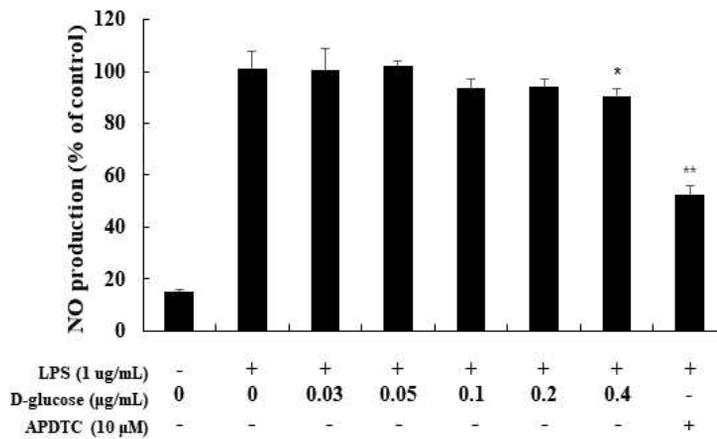
Figure 14. Effect of (a) nojiimycin (NJ) and (b) D-glucose on cell viability in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. Cells were each treated with (a) D-glucose (0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM), (b) NJ (0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3).

1.10.2. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

LPS 처리에 의한 RAW264.7 세포에서 NO 생성의 증가는 NJ와 D-glucose 처리군에서 농도 의존적일 감소되는 것으로 확인되었다 (**Figure 15**). 하지만 NJ의 농도가 0.4 mM에서 NO 생성을 약 39% 억제하는 반면, D-glucose의 농도가 0.4 mM에서는 약 9%를 억제하여 그 효과가 미미했다.



(a)



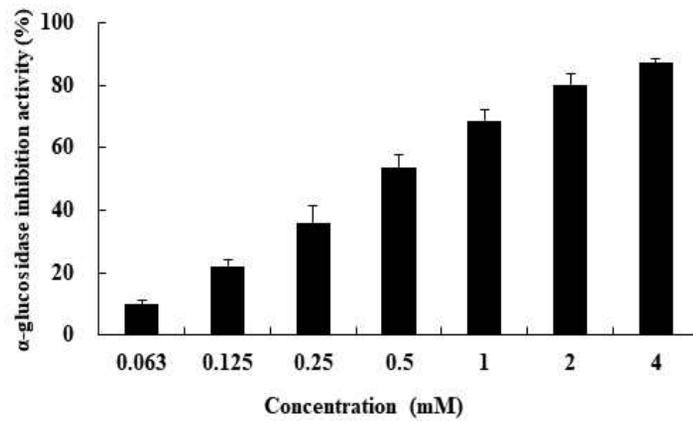
(b)

Figure 15. Effect of (a) nojirimycin (NJ) and (b) D-glucose on nitric oxide production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Cells were each treated with (a) D-glucose (0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM), (b) NJ (0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mM) for 24 h. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

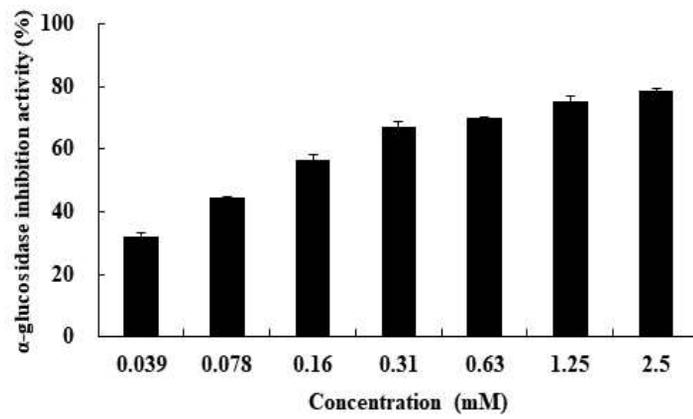
2. 1-deoxynojirimycin의 항비만, 미백 효능 스크리닝 및 항염증 효과

2.1. α -glucosidase inhibition activity

본 실험에서는 DNJ와 acarbose를 비교물질로 하여 α -glucosidase 저해 활성을 비교하였다 (**Figure 16**). 비교 물질로 사용한 acarbose보다는 약 3배 정도 강한 저해 활성을 보이며 농도 의존적으로 억제했다. 향후 이 샘플의 활성 물질 동정을 통한 활성 기작에 대한 연구가 필요하며 본 연구 결과는 α -glucosidase 저해 활성을 가지는 미백 기능성 원료 발굴을 위한 기초자료로 활용가능하리라 사료된다.



(a)

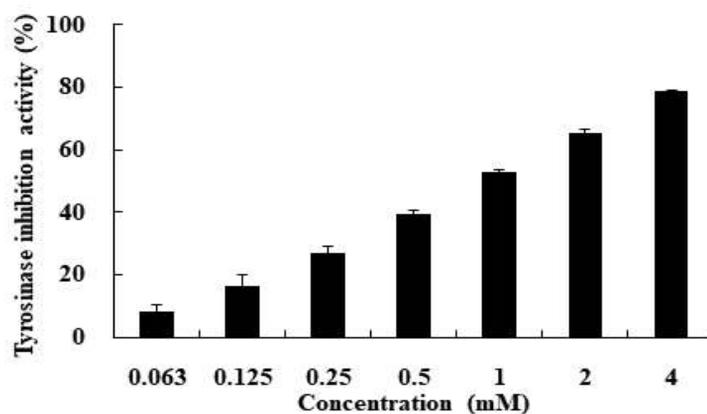


(b)

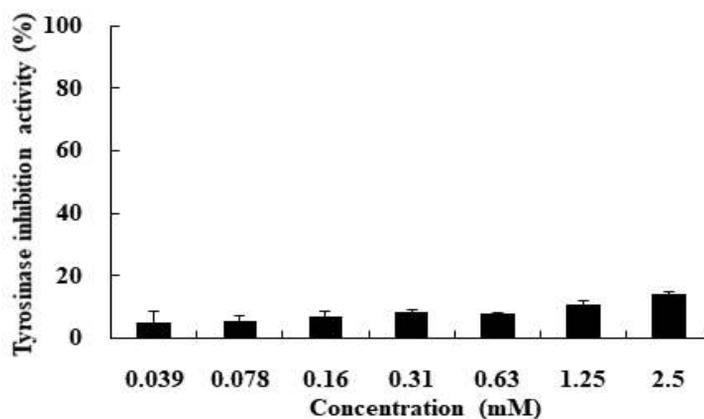
Figure 16. α -glucosidase Inhibition Activity of (a) acarbose ($IC_{50} = 0.45 \pm 0.017$ mM) and (b) 1-deoxynojirimycin (DNJ) ($IC_{50} = 0.17 \pm 0.002$ mM). The data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

2.2. Tyrosinase inhibition activity

본 실험에서는 DNJ와 대표적인 미백제로 알려져 있는 arbutin을 비교물질로 하여 tyrosinase 저해 활성을 비교하였다 (**Figure 17**). 비교 물질로 사용한 arbutin은 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성을 억제하였지만, DNJ의 저해 활성은 미미했다.



(a)



(b)

Figure 17. Tyrosinase Inhibition Activity of (a) arbutin ($IC_{50} = 0.44 \pm 0.013$ mM) and (b) DNJ ($IC_{50} > 2.5$ mM). The inhibition of DOPA Chrome, a reaction product produced by tyrosinase, was confirmed by measuring absorbance. The data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

2.3. 세포 독성 측정

MTT assay를 이용하여 RAW264.7 대식세포에서 1-deoxynojirimycin (DNJ)의 세포독성을 확인하였다 (**Figure 18**). DNJ를 농도별로 처리한 결과, 모든 농도에서 세포 생존률이 90% 이상을 나타내어 RAW264.7에 대해 독성을 나타내지 않았다. 따라서 추가적인 항염증 실험도 세포 생존률에 큰 영향을 미치지 않는 농도에서 진행하였다.

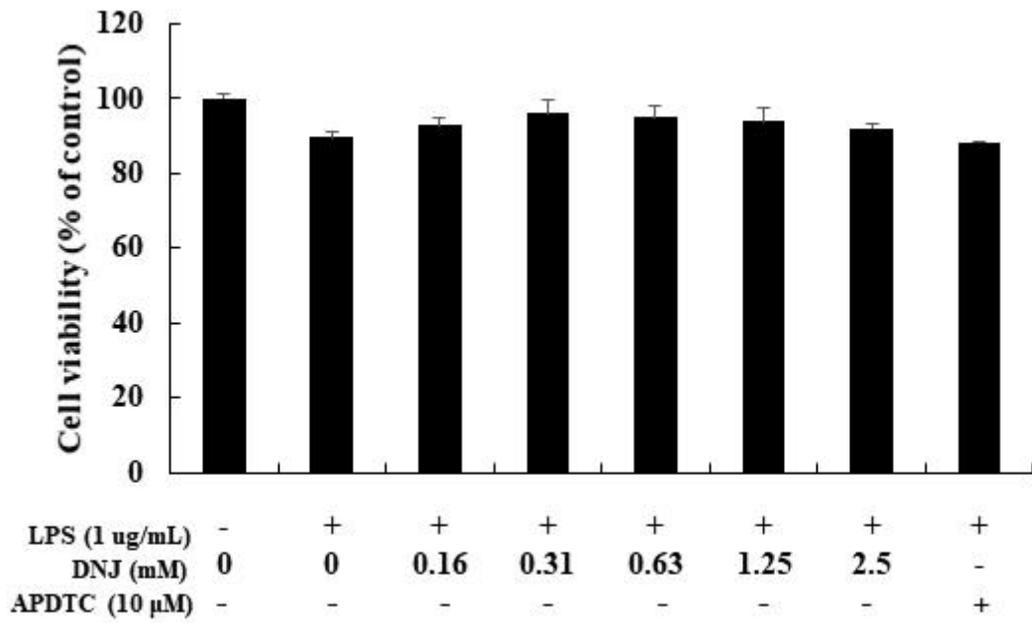
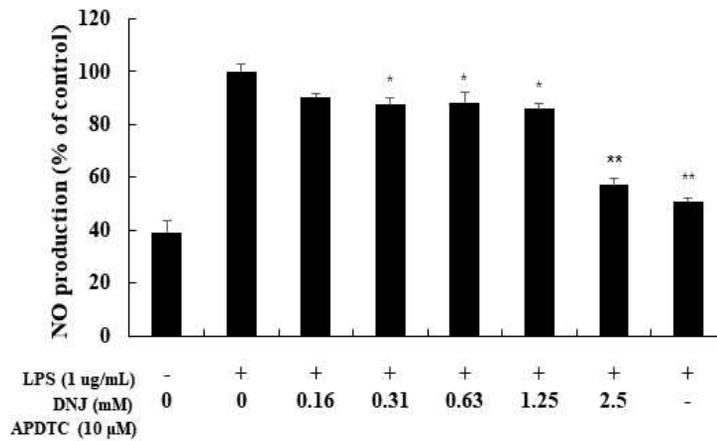


Figure 18. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on cell viability in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. Cells were each treated with DNJ (0.16, 0.31, 0.63, 1.25 and 2.5 mM) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3).

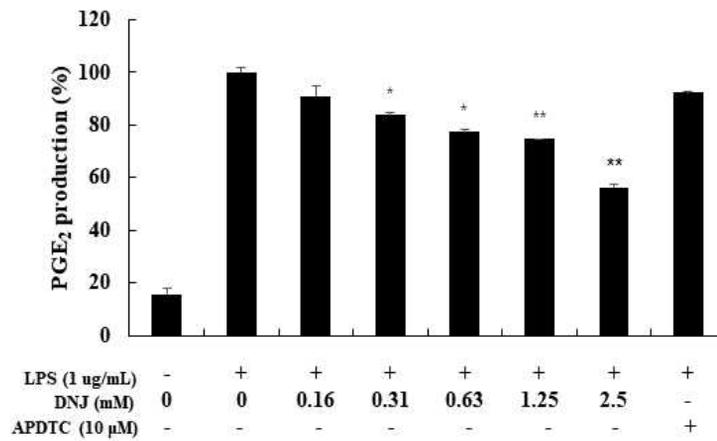
2.4. Nitric oxide (NO) 및 PGE₂ 생성량 측정

LPS 처리에 의한 RAW264.7 세포에서 NO 생성의 증가는 DNJ 처리군에서 농도 의존적으로 감소되는 것으로 확인되었다 (**Figure 19**). DNJ의 농도가 2.5 mM에서 NO 생성을 약 43% 억제하였다. 또한, DNJ의 고농도에서는 LPS를 처리하지 않는 정상군에 가까운 NO 생성량을 나타내어, 염증이 유도되었을 때 DNJ의 처리가 효과적으로 NO 생성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

또한, DNJ의 농도가 2.5 mM에서 PGE₂ 생성을 약 44% 억제하였다. 따라서 DNJ로 NO 생성과 관련 있는 iNOS [20] 와 PGE₂ 생성과 관련이 있는 COX-2 [20], 대표적인 염증신호 전달 경로인 mitogen-activated protein kinase (MAPKs), NF- κ B pathway [21]의 western blot 실험을 진행하였다.



(a)



(b)

Figure 19. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on (a) nitric oxide and (b) PGE₂ production in LPS-induced RAW264.7 macrophages. Cells were each treated with 1-deoxynojirimycin (0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 mM) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

2.5. 전염증성 cytokine 발현 측정

전염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 는 염증반응을 매개하는 물질로 특히 초기 염증반응에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 [22]. DNJ가 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7이 분비하는 염증성 사이토카인의 생성억제 효과를 측정하기 위해 ELISA 방법을 이용하였다.

DNJ는 염증이 유도된 RAW264.7에서 증가된 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다 (**Figure 20**). 농도 2.5 mM에서 IL-6의 생성을 LPS 단독 처리군에 비해 약 76% 억제하였고, TNF- α 의 생성은 약 46%, IL-1 β 의 생성은 약 28% 억제하였다. IL-6의 생성에서 가장 높은 억제효과를 나타내었고, IL-6와 IL-1 β 의 생성량은 고농도에서는 LPS를 처리하지 않는 정상군에 가까운 생성량을 보이고 있다.

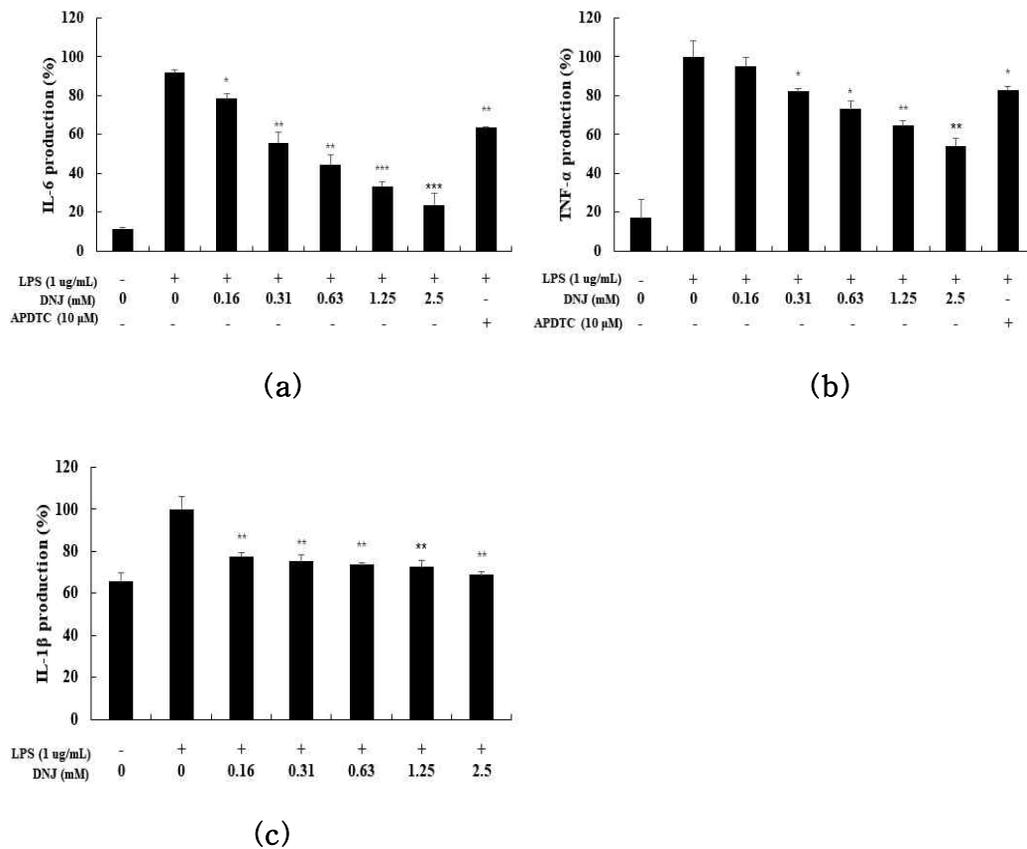


Figure 20. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on LPS-induced (a) IL-6, (b) TNF- α and (c) IL-1 β production in macrophages. RAW264.7 cells incubated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h in the presence or absence of 1-deoxynojirimycin (0.15, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 mM). Culture supernatants were collected and analyzed for the presence of IL-6, TNF- α and IL-1 β using enzyme-linked immunosorbent assays. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

2.6. iNOS, COX-2 발현량 측정

DNJ는 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7에서 효과적으로 NO와 PGE₂ 생성을 억제하였다. 이러한 NO 생성과 관련이 있는 iNOS와 PGE₂ 발현의 매개가 되는 COX-2 단백질 발현 억제에 영향을 끼치는지 확인하기 위해 western blot 실험 기법을 통해 확인하였다.

LPS 처리에 의한 iNOS, COX-2 생성의 증가는 DNJ 처리군에서 농도 의존적으로 감소되는 것으로 확인되었다 (**Figure 21**). RAW264.7 세포만 배양한 무처리군에서는 iNOS의 발현이 나타나지 않았으나 LPS를 처리한 군에서는 iNOS의 발현이 무처리군에 비하여 현저히 증가하였다. iNOS 발현은 DNJ의 농도가 2.5 mM일 때, 단백질의 발현이 대조군에 비해 약 76% 억제되었다. COX-2의 발현은 DNJ의 농도가 2.5 mM일 때, 단백질의 발현이 대조군에 비해 약 84% 억제되었다.

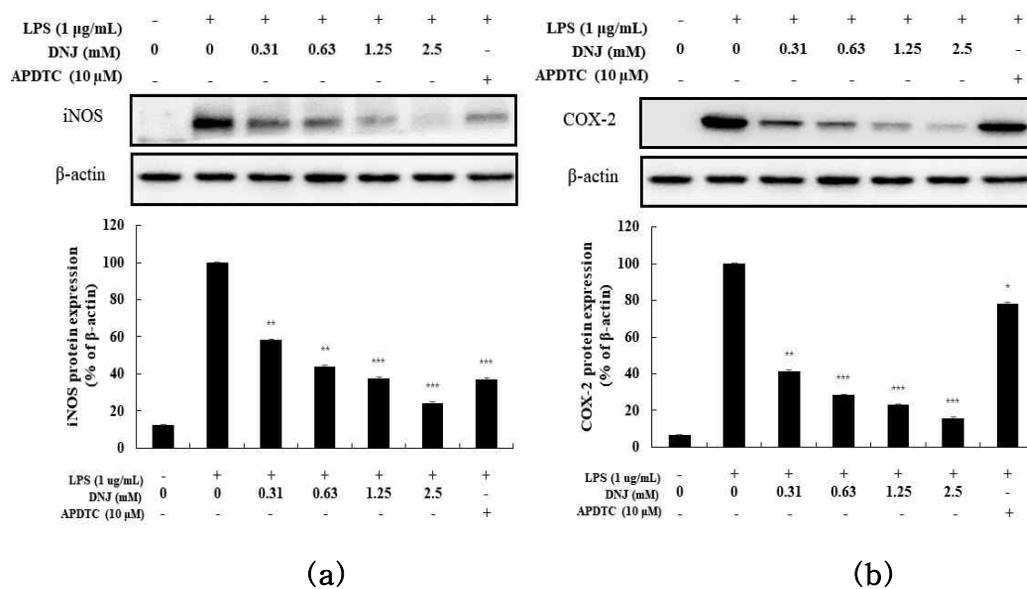
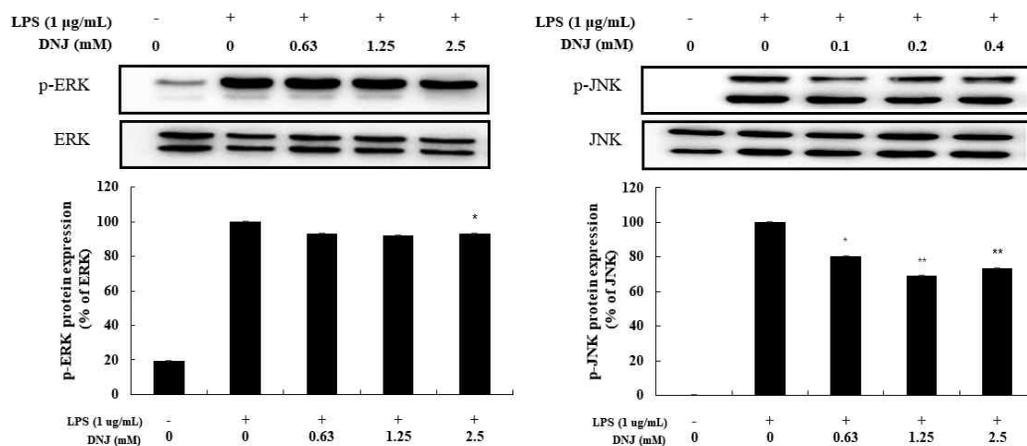


Figure 21. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on the level of iNOS, COX-2 protein in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells incubated with LPS (1 µg/mL) for 24 h in the presence or absence of DNJ (0.31, 0.63, 1.25, 2.5 mM). **(a)** iNOS protein level, **(b)** COX-2 protein level was validated by Image J. β-actin was used as an internal control. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

2.7. MAPKs 발현량 측정

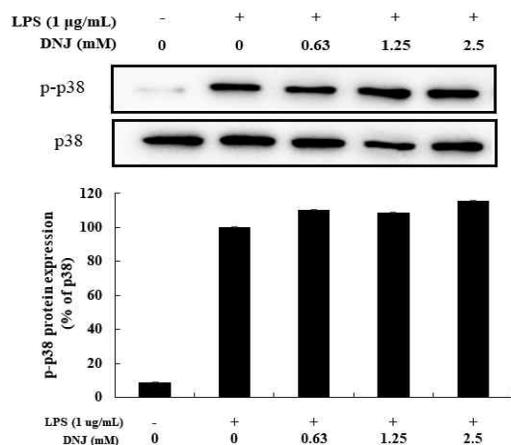
MAPKs와 NF- κ B 경로는 면역세포에서 면역 활성을 매개하는 대표적인 신호 전달 체계이다. 이들은 외부 자극에 의해 면역반응이 매개되면서 면역세포 내부의 신호전달 체계가 활성화되면서 NO, 사이토카인 등의 분비가 촉진된다 [23]. 대표적인 MAPKs의 단백질에는 ERK, JNK, p38 등이 있으며, 각 단백질의 인산화 유무에 따라 활성을 판단한다 [24]. 이에 NJ에 의한 효과의 분자적 기전을 조사하기 위하여 ERK, JNK, p38 단백질의 발현량을 살펴보았다 (**Figure 22**).

LPS 처리 시 ERK, JNK, p38 인산화가 증가되었으며, DNJ 처리군에서는 p-ERK가 약 7%, p-JNK가 약 27% 억제되었다.



(a)

(b)



(c)

Figure 22. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on activations of ERK 1/2, JNK 1/2 and p38 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells incubated with LPS (1 µg/mL) for 20 min in the presence or absence of DNJ (0.63, 1.25, 2.5 mM). **(a)** ERK 1/2 protein level, **(b)** JNK 1/2 protein level, **(c)** p38 protein level was validated by Image J. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

2.8. NF- κ B 발현량 측정

Figure 23에 나타난 바와 같이, LPS 단독 처리군에서 I κ B- α 는 인산화되고 복합체에서 분리된다. DNJ 처리군에서는 I κ B α 의 분해가 점차 억제되었다. 그에 따라 I κ B α 의 인산화도 억제되었다.

또한, p65와 p105의 활성화된 형태인 p-p65 및 p-p105의 발현은 LPS 처리 후 증가되었다. p-p105의 발현은 DNJ 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. DNJ의 농도가 2.5 mM에서 p-p105의 발현은 약 55% 억제되었다.

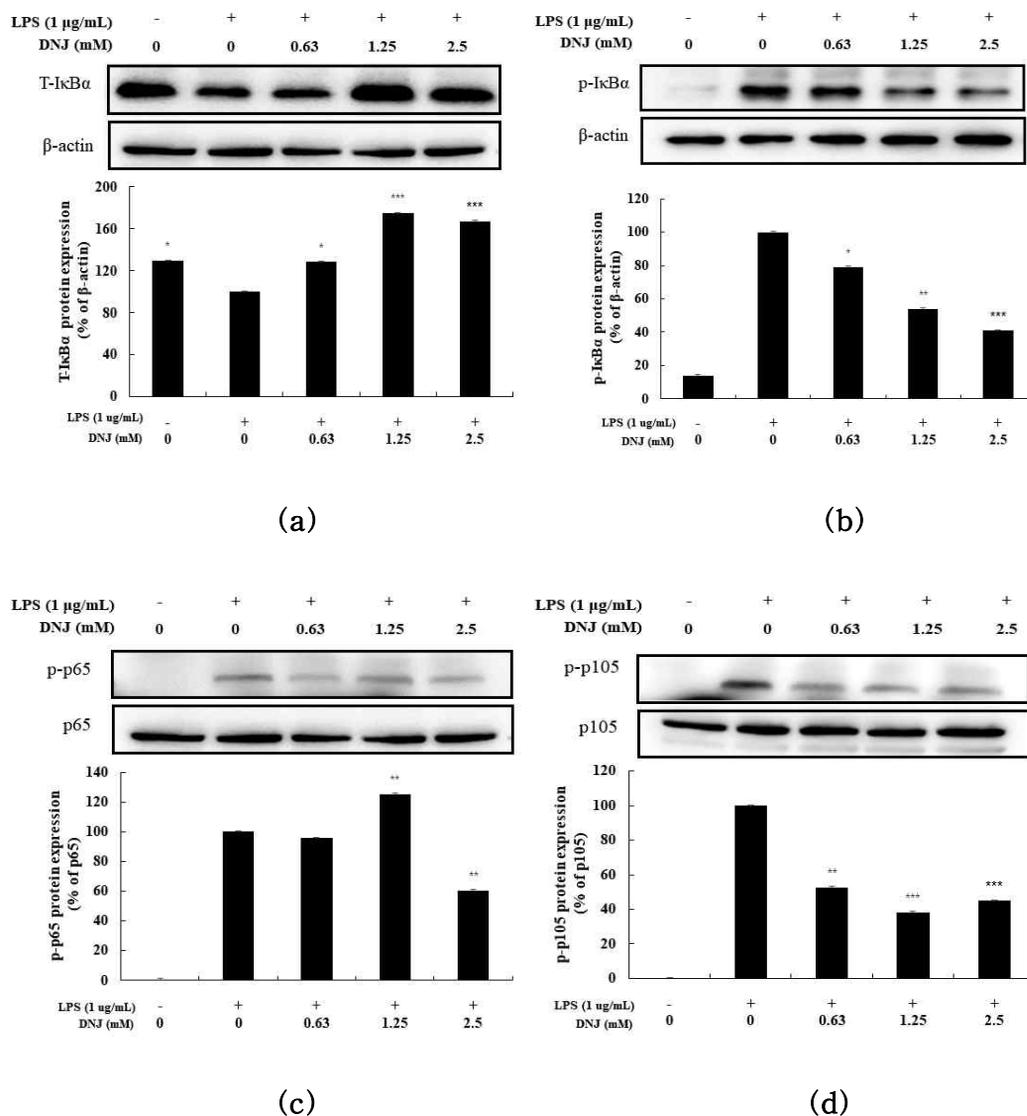


Figure 23. Effect of 1-deoxynojirimycin (DNJ) on phosphorylation of IκB-α, and IκB-α, phosphorylation of p65 and p105 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells incubated with LPS (1 μg/mL) for 20 min in the presence or absence of DNJ (0.63, 1.25, 2.5 mM). (a) IκB-α protein level, (b) p-IκB-α protein level, (c) p-p65 protein level (d) p-p105 protein level was validated by Image J. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus treated control.

IV. 고찰

본 연구에서는 nojirimycin (NJ)과 1-deoxynojirimycin (DNJ)의 항염증 효과를 확인하기 위해 RAW264.7 대식세포에서 NO 생성 억제 활성, 전염증성 사이토카인 및 PGE₂ 생성 억제 활성 실험을 진행하였고, MAPKs 및 NF- κ B 신호전달 경로에 대한 메커니즘 규명 연구를 수행하였다.

NO는 피부손상 및 노화의 주요 원인이 되며 매우 불안정한 화합물로서 LPS와 같은 염증유발물질에 의해 과도한 증가는 패혈성 쇼크, 류마티스관절염 등과 같은 염증성 질환을 유발한다 [26]. 또한, iNOS는 세포내 존재하지 않으나 일단 자극에 의해 유도가 되면 NO 생성을 증가시킨다. 그리고 LPS와 같은 자극에 의해 COX-2는 발현되어 prostaglandin을 생성시키며 염증반응을 유도하고, 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다 [27,28]. 그러므로 NO, iNOS, COX-2 발현량의 억제는 염증을 억제하는 효과를 나타낼 수 있다. 또한 염증반응시 COX-2에 의해 생성되는 PGE₂도 염증관련 질병을 유발하는 것으로 보고되고 있다 [29]. NJ와 DNJ는 세포 독성이 나타나지 않는 범위에서 NO, PGE₂, iNOS, COX-2의 발현량을 현저히 감소시켰으며, 이는 NJ, DNJ가 항염증 효과를 나타내는 물질이라는 것을 나타낸다.

또한, 염증매개인자에 의해 활성화된 대식세포는 NO와 prostaglandin의 유리와 더불어 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 포함한 다양한 사이토카인을 생성하여 감염 초기의 염증반응을 증폭시킨다 [30]. NJ와 DNJ는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 모두 농도 의존적으로 억제시켰다.

LPS로 자극된 대식세포에서 NF- κ B와 MAPKs 신호전달 경로는 염증인자 발현을 조절하는 주요 경로로 알려졌다. 따라서 NJ와 DNJ가 어떤 경로를 통해 항염증 효과를 보이고 있는지 확인해보았다. 이 신호경로들은 LPS에 의해 유도되어 인산화되면서 활성화된다. NJ의 경우 MAPKs 신호전달 경로에 대해서는 아무런 영향을 미치지 못했지만, I κ B- α 의 인산화를 억제시켜 NF- κ B의 활성을 저해하였다. 반면, DNJ의 경우 MAPKs 신호전달 경로 중에서 ERK와 JNK의 인산화를 억제시켰고, I κ B- α 의 인산화를 억제시켜 NF- κ B의 활성을 저해하였다.

또한 NJ는 D-glucose와 유사한 구조를 가지고 있지만, 항염증 효과는 큰 차이를 보이고 있다. 같은 농도에서 NJ는 우수한 항염증 효과를 가지고 있는 반면, D-glucose의 그 효과는 미미했다. D-glucose는 고리의 산소가 있는 반면, NJ는 고리의 질소가 있다. 본 실험 결과는 효능의 정도가 구조적 차이에 기인한 것으로, 항염증 효과가 고리의 질소에 의해서 나타난 것을 암시한다 (Figure 24).

또한 NJ와 DNJ는 D-glucose와 유사한 구조를 가지고 있지만 glucosidase를 저해하는 것으로 알려진 흥미로운 화합물이다. 따라서 α -glucosidase 저해 효과를 한 번 더 입증하기 위해 실험을 진행한 결과 비교물질보다 2-3배 정도 강한 활성을 보였다. 추가로 미백활성을 스크리닝하기 위해 tyrosinase 저해 활성 실험을 진행한 결과, NJ는 arbutin보다 강한 활성을 보였지만, DNJ는 그 효과가 미미했다. NJ는 C-1의 OH기에 의해 열린 사슬 형태의 aldehyde 타입의 이성질체가 있지만, DNJ의 경우 열린 사슬 형태가 될 수 없다. 이는 NJ의 미백 활성이 C-1에 붙어 있는 작용기에 의한 구조적 차이에 기인함을 암시한다 (Figure 20).

결론적으로 NJ와 DNJ의 의약품 사용 적합성을 확인하려면 추가 실험이 필요하지만, 우리는 이 오래된 항생제의 새로운 효능이 입증되었다고 생각한다.

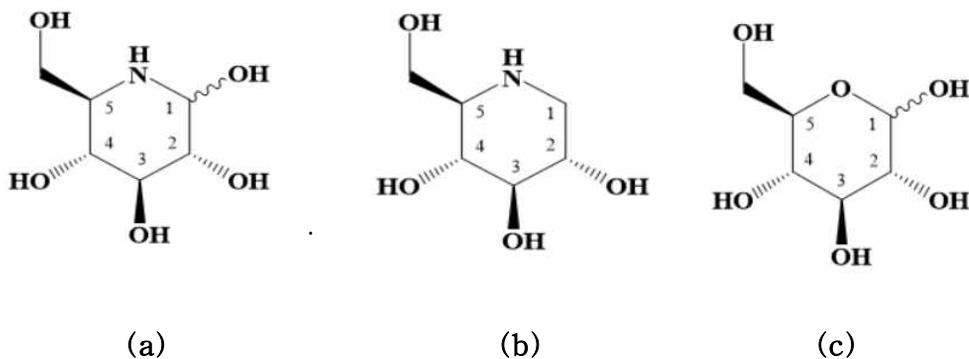


Figure 24. Structures of (a) nojirimycin, (b) 1-deoxynojirimycin and (c) D-glucose

V. 참고문헌

1. Willoughby, D. A. (1975). Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Annals of the rheumatic diseases*, 34(6), 471.
2. Kim, S. J., Jang, T. W., Kim, D. W., Park, J. H. (2015). Study on Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Persicaria tinctoria*. *The Korea Journal of Herbology*, 11, 17-24.
3. Lee, E. J., Seo, Y. M., Kim, Y. H., Chung, C. W., Sung, H. J., Sohn, H. Y., Park, J. Y., Kim, J. S. (2019). Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from Leaf, Seed, and Seedpod of *Nelumbo nucifera*. *Journal of Life Science*, 29(4), 436-441.
4. Kim, M. J., Bae, N. Y., Kim, K. B. W. R., Park, S. H., Jang, M. R., Im, M. H., Ahn, D. H. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Ethanol Extract of *Sargassum miyabei* Yendo via Inhibition of NF- κ B and MAPK Activation. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 44(4), 442-451.
5. Xie, Q. W., Whisnant, R., Nathan, C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*, 177(6), 1779-1784.
6. Dou, W., Zhang, J., Sun, A., Zhang, E., Ding, L., Mukherjee, S., Wei, X., Chou, G., Wang, Z. T., Mani, S. (2013). Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *British journal of nutrition*, 110(4), 599-608.
7. Jang, B. C., Paik, J. H., Kim, S. P., Shin, D. H., Song, D. K., Park, J. G., Suh M. H., Suh, S. I. (2005). Catalase induced expression of inflammatory

mediators via activation of NF- κ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cellular signalling*, 17(5), 625-633.

8. Celec, P. (2004). Nuclear factor kappa B—molecular biomedicine: the next generation. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58(6-7), 365-371.

9. Reber, L., Vermeulen, L., Haegeman, G., Frossard, N. (2009). Ser276 phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PloS one*, 4(2).

10. Inouye, S., Tsuruoka, T., Ito, T., Niida, T. (1968). Structure and synthesis of nojirimycin. *Tetrahedron*, 24(5), 2125-2144..

11. Reese, E. T., Parrish, F. W., & Ettliger, M. (1971). Nojirimycin and d-glucono-1, 5-lactone as inhibitors of carbohydrases. *Carbohydrate Research*, 18(3), 381-388.

12. Hardicka, D. J., Hutchinson, D. W. (1993). The biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Bacillus subtilis* var *niger*. *Tetrahedron*, 49(30), 6707-6716.

13. Wakabayashi, T., Joseph, B., Yasumoto, S., Akashi, T., Aoki, T., Harada, K., Muranaka, S., Bamba, T., Fukusaki, E., Takeuchi, Y., Yoneyama, K., Muranaka, T., Sugimoto, Y., Okazawa, A. (2015). Planteose as a storage carbohydrate required for early stage of germination of *Orobancha minor* and its metabolism as a possible target for selective control. *Journal of experimental botany*, 66(11), 3085-3097.

14. Tsuduki, T., Nakamura, Y., Honma, T., Nakagawa, K., Kimura, T., Ikeda, I., Miyazawa, T. (2009). Intake of 1-deoxynojirimycin suppresses lipid accumulation through activation of the β -oxidation system in rat liver. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 11024-11029.

15. Wang, R. J., Yang, C. H., & Hu, M. L. (2010). 1-Deoxynojirimycin inhibits

metastasis of B16F10 melanoma cells by attenuating the activity and expression of matrix metalloproteinases-2 and-9 and altering cell surface glycosylation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(16), 8988-8993.

16. Tong, J. J., Chen, G. H., Wang, F., Li, X. W., Cao, L., Sui, X., Tao, F., Yan, W. W., Wei, Z. J. (2015). Chronic acarbose treatment alleviates age-related behavioral and biochemical changes in SAMP8 mice. *Behavioural brain research*, 284, 138-152.

17. Balzarini, J. (2007). The α (1, 2)-mannosidase I inhibitor 1-deoxymannojirimycin potentiates the antiviral activity of carbohydrate-binding agents against wild-type and mutant HIV-1 strains containing glycan deletions in gp120. *FEBS letters*, 581(10), 2060-2064.

18. Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S., Nishiyama, S., Urabe, K., Hearing, V. J. (1993). Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(2).

19. Tibbot, B. K., Skadsen, R. W. (1996). Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Molecular Biology*, 30, 229-241.

20. Kim, Y. S., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, E. H., Park, P. J., Jeong, J. H. (2012). Anti-Inflammatory Effects of Extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. Leaves on RAW264.7 Macrophages. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41(9), 1205-1210.

21. Kim, B. H., Lee, Y. T., Kang, K. H. (2010). *Codonopsis lanceolata* Inhibits Inflammation through Regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*, 24(1), 80-84.

22. Kim, Y. J., Son, D. Y. (2014). Inflammatory mediator regulation of the Zizyphus jujube leaf fractions in the LPS-stimulated Raw264.7 mouse macrophage. *Korean Journal of Food Preservation*, 21(1), 114-120.
23. Brewer, M. S., Ikins, W. I. G., Harbers, C. A. A. (1992). TBA values, sensory characteristics and volatiles in ground pork during long-term frozen storage: Effects of packing. *Journal of Food Science*, 57(3), 558-563.
24. Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (2000). Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends in biochemical sciences*, 25(1), 7-9.
25. Kwon, D. H., Kang, H. J., Choi, Y. H., Chung, K. T., Lee, J. H., Kang, K. H., Hyun, S. K., Kim, B. W., Hwang, H. J. (2016). Immunomodulatory activity of water extract of Ulmus macrocarpa in Macrophages. *Journal of Life Science*, 26(1), 50-58.
26. Laskin, D. L., Pendino, K. J. (1995). Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 35(1), 655-677.
27. Chen, W., Tang, Q., Gonzales, M. S., Bowden, G. T. (2001). Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*, 20(29), 3921-3926.
28. Noh, K. H., Jang, J. H. Min, K. H., Chinzorig, R., Lee, M. O., Song, Y. S. (2011). Suppressive Effect of Green Tea Seed Coat Ethyl Acetate Fraction on Inflammation and Its Mechanism in RAW264.7 Macrophage Cell. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 40(5), 625-634.
29. DuBois, R. N., Tsujii, M., Bishop, P., Awad, J. A., Makita, K., Lanahan, A. (1994). Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 266(5), G822-G827.

30. Byun, S. H., Yang, C. H., Kim, S. C. (2005). Inhibitory effect of Scrophulariae Radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and Nitric Oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *The Korea Journal of Herbology*, 20(2), 7-16.
31. Moynagh, P. N. (2005). The NF- κ B pathway. *Journal of cell science*, 118(20), 4589-4592.