RAW264.7 세포에서 새싹보리 및 Luteolin의 히스톤 아세틸기전달효소 활성 억제를 통한 항염증 효능

이재인^{1,2} · 정민유¹

¹한국식품연구원 식품기능연구본부 맞춤형식이연구단

²전북대학교 농업생명과학대학 식품공학과

Barley Sprout Extract and Luteolin Mitigate LPS-Mediated Inflammation in RAW264.7 Murine Macrophages via Histone Acetyltransferase Activity Inhibition

Jae-In Lee^{1,2} and Min-Yu Chung¹

¹Personalized Diet Research Group, Korea Food Research Institute

²Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University

ABSTRACT This study aimed to assess the anti-inflammatory activity and the mechanism of anti-inflammatory action of barley sprout (*Hordeum vulgare* L.). Barley sprout powder (BSP), barley sprout ethanol extract (BSE), and barley sprout water extract (BSW) were prepared, and the inhibitory effects of the samples on nitric oxide (NO) production were evaluated. The results showed that the inhibitory activity of BSE and BSW on NO production was greater compared to BSP. Among the active compounds found in barley sprouts, luteolin exhibited greater inhibition of NO production and histone acetyltransferase (HAT) activity compared to the other compounds. Luteolin significantly ($P<0.05$) attenuated lipopolysaccharide (LPS)-mediated inflammatory mediators, including interleukin-6, tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase, and cyclooxygenase-2 in RAW264.7 cells. Luteolin also significantly inhibited *in vitro* specific HATs (p300, CBP, PCAF) as well as total HAT, which was also observed in the nuclear fraction of LPS-treated RAW264.7 cells. The anti-inflammatory activity of luteolin was attributed to total and specific HAT inhibition. Collectively, the anti-inflammatory activity of barley sprouts could be attributed to luteolin via HAT inhibition.

Key words: barley sprout, luteolin, histone acetyltransferase, RAW264.7, nitric oxide

서 론

만성 염증반응은 동맥경화, 천식 및 암 등을 유발할 수 있으므로(Kaplanski 등, 2003) 항염증 효능을 갖는 식품소재 및 성분의 개발 및 발굴에 관한 연구는 활발히 이루어져 왔다. 염증유도 케미컬 중 lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성세균의 세포 표면을 구성하는 물질로 국소 염증 등의 반응을 일으킨다고 알려져 있다. 특히 LPS는 대식세포에서 세포 내 전사인자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)를 활성화시키고, 신호전달경로의 활성을 통해 다양한 염증성 매개물질을 분비하도록 유도한다. 이러한 염증성 매개물질에는 interleukin(IL), tumor necrosis factor(TNF)- α , nitric

oxide(NO) 등이 있다(McDaniel 등, 1996; Kim 등, 2012). 염증성 매개물질 조절에 관여하는 항염증 기능성 식품소재 혹은 성분에 관한 연구는 지속적으로 이루어져 왔다.

새싹 채소의 기능성은 새싹이 함유하고 있는 다양한 영양 성분 및 페놀류에 기인한다(Plaza 등, 2003). 발아 과정 중 비타민 A, B, C, E와 각종 미네랄 및 다양한 페놀류 화합물 등 영양소 함량이 증가하므로 다 자란 식물보다 새싹의 영양 성분이 훨씬 풍부하다(Byun 등, 2015). 특히, 발아 과정의 초기에 영양성분의 축적이 많이 이루어진다(Donkor 등, 2012; Pajak 등, 2014). 이러한 이유로 새싹 채소는 건강에 이로운 기능성을 나타내며, 양배추, 케일, 브로콜리, brussels 등 새싹의 항산화 및 항염증 효능들이 보고되었다(Vale

Received 10 November 2021; Revised 18 November 2021; Accepted 26 November 2021

Corresponding author: Min-Yu Chung, Personalized Diet Research Group, Korea Food Research Institute, 245 Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeonbuk 55365, Korea, E-mail: mic07002@kfri.re.kr

Author information: Jae-In Lee (Graduate student)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://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.

등, 2014). 새싹보리(*Hordeum vulgare* L.)는 보리 씨앗에서 자라는 어린잎으로 길이 약 10 cm 이내의 잎이다(Byun 등, 2015). 최근 새싹보리에 대한 관심이 높아져 새싹보리가루를 우려 음료로 섭취하는 등 여러 나라에서 그 수요가 증가하고 있다(Islam 등, 2019). 새싹보리의 여러 기능성이 보고되었다. Lee 등(2016)의 연구에 의하면, 새싹보리는 LPS 처리 RAW264.7 세포 및 알콜성 지방간 마우스 모델에서 TNF- α , cyclooxygenase-2(COX-2), inducible nitric oxide synthase(iNOS) 등의 발현을 억제하여 염증반응을 완화시켰다. 또한, 중성지방 축적 억제를 통한 새싹보리 추출물의 항비만 효과가 최근 연구되었다(Not published data).

새싹보리는 비타민 C 등의 영양성분 외에 saponarin, isorhamnetin, isoorientin, luteolin 등 다양한 폴리페놀류를 포함한다(Lahouar 등, 2015; Idehen 등, 2017). Saponarin은 새싹보리의 주요 활성 성분 중 하나로 3T3-L1 지방전구 세포에서 중성지방 축적 억제를 유도하며, 이는 중성지방합성에 관여하는 diacylglycerol acyltransferase(DGAT) 1, glycerol-3-phosphate acyltransferase(GPAT) 등의 발현 억제와 관련이 있다(Not published data). 또한, luteolin은 LPS로 염증이 유도된 대식세포주에서 COX-2와 microsomal prostaglandin E synthase-1(mPGES-1)의 발현을 억제하며(Wang 등, 2007), extracellular signal-regulated kinase1/2(ERK1/2) 매개 signaling 조절을 통하여 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현을 증진시켜 iNOS, COX-2, NF- κ B 등 염증매개인자의 발현을 억제한다(Park 등, 2018). 따라서 새싹보리의 기능성은 saponarin, luteolin 등을 포함한 폴리페놀류의 활성에 기인한다고 할 수 있다.

LPS는 NO, prostaglandin E2(PGE2), TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 염증성 매개체의 생성을 촉진시킨다. LPS는 면역반응을 매개하는 중요한 전사인자인 NF- κ B 프로모터에 작용하여 활성을 증가시킨다. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2)는 항염증반응에 관여하는 주요 전사인자이며, Nrf2와 NF- κ B 매개 pathways의 불균형은 염증 관련 여러 질병(암, 자가면역질환 등)을 일으킨다(Guo 등, 2016; Ben-Neriah와 Karin, 2011). NF- κ B는 p65 등을 포함하는 전사인자의 family를 일컫는데, p65와 Nrf2는 transcriptional coactivator인 p300을 두고 경쟁한다(Wardyn 등, 2015). 따라서 LPS 등에 의한 p65의 과발현은 p300의 availability를 감소시켜 Nrf2의 복합체 형성을 방해하며(Wardyn 등, 2015), p65 매개 염증성 인자들의 발현을 증가시켜 염증반응을 유도 및 악화시킨다(Wang 등, 2018). 식이 소재 및 파이토케미컬은 후성유전적 조절을 통해서 유전자의 염기서열 변화 없이 유전자의 발현을 조절할 수 있으며, 이를 통한 다양한 표현형의 변화를 유도한다. 예를 들어, 곰취 추출물은 히스톤 아세틸기전달효소(histone acetyltransferase, HAT) 활성 억제제의 역할을 한다(Kim 등, 2019). 곰취 추출물은 LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7

세포에서 염증성 매개물질의 발현을 억제하는데, 이는 p65 K310의 아세틸화를 억제시켜 p65의 핵 내 이동을 억제함으로써 이루어진다(Kim 등, 2019).

본 연구에서는 새싹보리 추출물 및 주요 활성 성분을 이용하여 후성유전적 조절을 통한 항염증 효능에 대한 연구를 수행하고자 하였다. 새싹보리를 동결건조한 후 얻은 분말, 새싹보리 주정 및 열수 추출물의 항염증 효능 및 HAT 활성 조절능을 평가하고, 활성 성분으로 알려진 5종의 케미컬을 구입하여 동일한 효능을 평가하였다. 주요 활성 성분 중 luteolin의 항염증 활성 및 HAT 활성 억제능이 가장 뛰어났으며, luteolin은 LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 마우스 대식세포의 핵 내에서 total HAT 활성을 유의적으로 억제하였다.

재료 및 방법

RAW264.7 세포배양

RAW264.7 세포는 ATCC(TIB-71; Manassas, VA, USA)에서 구매하였다. RAW264.7 세포는 10% fetal bovine serum(FBS; Welgene Inc., Gyeongsan, Korea)과 1% antibiotics/antimycotics(Welgene Inc.)를 첨가한 배지(DMEM-high glucose; Corning, Manassas, VA, USA)에 incubation 하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

새싹보리 추출

주정추출을 위하여 새싹보리(1 kg)에 추출용매로 70% 에탄올 15 L를 넣고 70°C에서 2시간 동안 진공추출농축기를 이용하여 추출하였다. 추출된 새싹보리 추출물은 필터프레스를 이용하여 1~2.25 μ m의 여과패드로 1회 여과한 후 30분 동안 43~50°C, -0.084 MPa에서 감압 농축시킨 뒤, -20°C에서 동결시켰다. 동결 건조를 통해 분말 형태의 시료를 얻었다. 열수 추출을 위하여 새싹보리 1 kg에 추출용매로 정제수 15 L를 넣고 95°C에서 2시간 동안 진공추출농축기를 이용하여 추출하였다. 추출된 새싹보리 추출물을 15,000 rpm으로 30분가량 원심분리 후, -20°C에서 동결시켜 분말 형태의 시료를 얻었다.

MTT assay

RAW264.7 세포가 약 70% confluence에 도달하였을 때, trypsin-EDTA(Welgene Inc.)를 이용하여 세포를 떼어내어 96-well plate에 seed 하였다(2.5×10^5 cells/mL). 24시간 이후 세포를 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Welgene Inc.)으로 2회 세척하고 fresh DMEM 배지로 교체하였다. LPS(100 ng/mL)를 처리하고 동시에 새싹보리 추출물 혹은 활성 성분을 농도별로 처리하였다. 새싹보리 동결건조 분말(barley sprout powder; BSP), 새싹보리 주정추출물(barley sprout ethanol extract; BSE), 새싹보리 열수 추출물(barley sprout water extract; BSW)은 50,

100, 200, 400 µg/mL로 처리하였다. 활성 성분(vanillic acid, saponarin, isorhamnetin, luteolin, ferulic acid)은 10, 25, 50, 100 µM 농도로 각각 처리하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution을 배지에 첨가하여 2시간 동안 추가 배양하였다. 이후 형성된 blue formazan을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 570 nm와 630 nm에서 세포 생존율을 측정하였다(microplate reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

WST-1 assay

RAW264.7 세포를 위의 방법으로 동일하게 seeding 하고, luteolin을 10, 20, 25, 50, 80 100 µM 농도로 LPS(100 ng/mL)와 동시 처리하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Cell proliferation reagent WST-1(WST-1, Roche Holding AG, Basel, Swiss) solution을 배지에 첨가하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 이후 형성된 tetrazolium salts formazan을 450 nm에서 측정하였다(microplate reader; Molecular Devices).

NO 생성

RAW264.7 세포에 LPS를 100 ng/mL 농도로 처리하여 염증반응을 일으키고, 이때 생성되는 활성질소종인 NO의 양을 측정하였다. RAW264.7 세포를 배양하여 plate에 seed하고, LPS(100 ng/mL) 및 새싹보리 분말 및 추출물(50, 100, 200, 400 µg/mL) 혹은 활성 성분(10, 25, 50 µM)을 각각 RAW264.7 세포에 처리하였다. 24시간 후 배양액 중에 존재하는 nitrite 형태를 Griess reagent와 반응시켜 흡광도를 540 nm에서 측정하였다(Promega Corporation, Madison, MI, USA). Sodium nitrite를 이용한 표준곡선을 이용하여 NO 생성 농도를 계산하였다.

ELISA

RAW264.7 세포를 배양하여 plate에 seed 하고, LPS(100 ng/mL) 및 luteolin(10, 25, 50 µM)을 각각 세포에 처리하였다. 24시간 후 회수한 배양 배지를 이용하여 염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF-α를 ESLIA 방식으로 측정하였다. ELISA는 BD 사(Franklin Lakes, NJ, USA)에서 제공하는 키트를 사용하였으며, 총 단백질(BCA assay, iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Korea) 함량으로 최종 normalize 하였다.

HAT 활성

새싹보리 활성 성분인 vanillic acid, saponarin, isorhamnetin, luteolin, ferulic acid의 *in vitro* HAT 활성 조건을 HAT activity assay kit(BioVision Biotechnology, Milpitas, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. Cell free

condition assay에서는 HAT 효소의 공급원으로 HeLa cell nuclear extract(NE; BioVision Biotechnology), p300, CREB binding protein(CBP), p300/CBP-associated factor(PCAF) recombinant enzymes(Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA)를 이용하였다. 96-well plate에 20 µg의 활성 성분 5종을 25, 50 µM 농도로 넣어준 후 최종 볼륨이 40 µL가 되도록 증류수를 넣었다. 상업적으로 제공되는 substrate인 histone H3 tail(5 µL), cofactor인 acetyl-CoA(5 µL), NADH generating enzyme(8 µL)을 2×HAT assay buffer(50 µL)에 넣어 섞은 후, 앞서 준비된 well에 68 µL씩 넣었다. Microplate reader(Molecular Devices)를 이용하여 440 nm 파장에서 OD값을 측정하고 75분 후 변화한 HAT activity를 계산하였다. IC₅₀값은 GraphPad Prism software(version 7.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 계산하였다.

RAW264.7 세포에서 luteolin에 의한 total HAT 활성 조건을 평가하기 위하여 상업적으로 판매되는 Nucleaer Extraction Kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 cytosol과 핵을 분리 추출하였다. 추출한 핵의 단백질은 BCA assay 법으로 단백질을 정량하였다(iNtRON Biotechnology Inc.). 추출한 핵을 2 µg의 농도로 넣어준 후, HAT activity assay kit을 이용하여 luteolin에 의해 조절되는 HAT 활성을 측정하였다. 그 후 cytosol과 핵의 분리 확인을 위하여 10 µg의 단백질을 10% SDS page gel에 전기영동하고, 항체[HDAC1(Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), α/β-tubulin(Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), GAPDH(Cell Signaling Technology Inc.)]를 western blot 하였다. 각각의 단백질 발현량은 ECL solution(Thermo Fisher Scientific)으로 incubation 하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

Western blot

RAW264.7 세포를 10% FBS와 1% antibiotics anti-mycotic solution이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 5×10⁵ cells/mL로 6-well plate에 세포를 분주하였고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 LPS 100 ng/mL와 luteolin(25, 50 µM) 농도의 시료를 동시에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 DPBS로 1회 세척 후 세포를 회수하였다. 원심분리(13,000 rpm, 1 min)하여 얻어진 세포는 cell lysis buffer(Cell Signaling Technology Inc.)를 사용하여 lysis한 후, BCA assay 법으로 단백질을 정량하였다(iNtRON Biotechnology Inc.). 20 µg의 단백질을 8~10% SDS page gel에 전기영동하였고 항체[iNOS(Cell Signaling Technology Inc.), COX-2(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), actin(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)]를 western blot 하였다. 각각의 단백질 발현량은 ECL solution(Thermo Fisher Scientific)으로

incubation 하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

통계분석

본 연구에서는 최소 3회 반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 실험군 간의 통계적 유의성은 Student's *t*-test를 사용하여 검정하였다. 통계검정은 GraphPad Prism software(version 7.0)를 이용하였다.

결과 및 고찰

새싹보리 추출물의 세포 생존능과 NO 생성 조절

새싹보리를 동결건조하여 얻은 BSP, 주정 및 열수 추출 후 동결건조하여 얻은 BSE 및 BSW를 50, 100, 200, 400 µg/mL 농도로 RAW264.7 세포에 처리하여 MTT 용액 처리 후 세포 생존능을 관찰하였다. BSP는 농도 의존적으로 RAW264.7 세포 생존능을 감소시켰으며, 특히 400 µg/mL BSP 처리 시 세포 생존능은 80% 정도로 감소하였다(Fig. 1A). 하지만 BSE와 BSW의 경우 400 µg/mL 농도 처리까지 RAW264.7 세포의 생존능에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1A). 동일한 농도의 BSP, BSE, BSW를 RAW264.7 세포에 처리하고 24시간 후 배양액에서 NO 생성 정도를 관찰하였다. 그 결과 BSP, BSE, BSW 모두 50 µg/mL 농도 처리부터

LPS에 의해 증가한 NO 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 이는 통계적으로도 유의하였다($P < 0.05$; Fig. 1B). 새싹보리 주정 및 열수 추출물 모두 항염증 효능을 가질 가능성을 제시하고 있으며, BSP의 경우는 NO 생성 억제능이 세포 생존을 저하와 관련이 있는 것으로 사료된다.

새싹보리의 항염증 효능은 보고된 바 있다. Lee 등(2016)의 연구에서 새싹보리 추출물(30% 발효 에탄올 추출물)이 NO 생성을 억제하고 염증마커의 단백질 및 유전자 발현을 억제하여 알콜성 지방간 마우스의 염증반응을 완화시킴을 밝혔다(Lee 등, 2016). 본 연구에서는 마우스 대식세포에서 새싹보리 주정(70% 에탄올 추출물)과 열수 추출물의 NO 생성 억제능을 새싹보리 분말 형태와 비교하였는데, 에탄올과 열수를 포함한 추출물의 NO 생성 억제능이 추출하지 않은 분말 형태보다 더 뛰어났다. 또한, Lee 등(2016)의 연구와 비교했을 때, 본 연구에서 사용한 에탄올 추출물이 저농도에서 더욱 효과적으로 NO 생성을 억제하였다. 본 연구에서는 BSE 200 µg/mL 처리 시 대조군 대비 NO 생성을 50% 억제하였으나, Lee 등(2016)의 연구에서는 새싹보리 추출물 500 µg/mL 농도 처리 시 대조군 대비 50%가량 NO 생성을 억제시켰다.

새싹보리 유효성분의 세포 생존능과 NO 생성 조절

앞서 확인된 새싹보리 추출물의 항염증 효능을 조절하는

Fig. 1. Cell viability (A) and nitric oxide (NO) production (B) regulated by barley sprout powder (BSP; 50~400 µg/mL), barley sprout ethanol extract (BSE; 50~400 µg/mL), and barley sprout water extract (BSW; 50~400 µg/mL) in RAW 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with LPS control.

주요 활성 성분을 밝히고자 문헌검색을 통하여 새싹보리 추출물이 함유하는 플라보노이드를 선별하였다(Zheng 등, 2018; Choi 등, 2019; Aborus 등, 2017; Benedet 등, 2007). Vanillic acid, saponarin, isorhamnetin, luteolin, ferulic acid 등 5종 케미컬을 이용하여 MTT 기반 세포 생존능 및 NO 생성 정도를 평가하였다. Vanillic acid와 ferulic acid는 100 μ M 처리 시까지 RAW264.7 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으나, saponarin, isorhamnetin, luteolin은 고농도 처리 시 세포 생존율을 저하시켰다(Fig. 2A). Saponarin은 100 μ M 처리 시 90% 이하로 생존율을 감소시켰으며, isorhamnetin은 50 μ M 농도부터, luteolin은 100 μ M 농도 처리 시 세포 생존율을 급격하게 저하시켰다(Fig. 2A).

5종 케미컬의 배양액 중 NO 생성 억제능을 평가하였는데, LPS에 의해 유의적으로 증가한 NO 생성을 유의적으로 감소시킨 소재는 isorhamnetin, luteolin과 ferulic acid였다($P < 0.05$; Fig. 2B). 세포 생존율에 대한 영향을 고려하였을 때 NO 생성을 억제시키는 항염증 효능의 가능성이 가장 높은 소재는 isorhamnetin과 luteolin이었다. 저농도(10 μ M)의 isorhamnetin과 luteolin 처리 시 유의하게 NO 생성을 감소시켰으며($P < 0.0001$), 특히 저농도의 luteolin은 LPS에

의한 NO 생성을 50%가량 억제하였다(Fig. 2B). 새싹보리 추출물의 항염증 효능은 isorhamnetin과 luteolin에 기인한 것이라 할 수 있겠다.

Luteolin은 플라보노이드의 일종으로 셀러리, 브로콜리, 아티초크, 파슬리, 카모마일 티, 올리브오일, 오렌지, 오레가노 등의 채소류 및 과일류에 존재한다(Shimoi 등, 1998; López-Lázaro, 2009). Luteolin의 항염증 효능에 대한 연구는 이루어져 왔다. LPS로 염증이 유도된 마우스의 간에서 luteolin은 P2X7 receptor(P2X7R)-receptor for advanced glycation end products(RAGE)-toll-like receptor4(TLR4) axis를 통해 release 되는 high-mobility group box 1(HMGB1)을 조절하여 항염증 효능을 나타낸다(Zhang 등, 2021). 또한, galactosamine(D-Gal)/LPS로 염증이 유도된 마우스의 간에서 luteolin은 NLRP3/NF- κ B pathway의 조절을 통하여 염증성 사이토카인의 생성을 억제하였다(Pu 등, 2021). 이외에도 luteolin은 TLR4/NF κ B pathway를 통하여 Th1/Th2 불균형과 염증을 완화시켜 알레르기 반응 완화(allergic rhinitis)에도 효과적이다(Dong 등, 2021). 하지만 luteolin을 이용한 항염증 연구에서 후성유전적 pathway 조절을 통한 염증 완화를 연구한 논문은 전무하다. 따라서 본 연구에서는 HAT의 활성 조절 등 후성

Fig. 2. Cell viability (A) and nitric oxide (NO) production (B) regulated by active compounds contained in barley sprout, including vanillic acid, saponarin, isorhamnetin, luteolin, and ferulic acid (10~100 μ M) in RAW264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with LPS control.

Fig. 3. *In vitro* histone acetyltransferase (HAT) activity regulated by vanillic acid, saponarin, isorhamnetin, luteolin, and ferulic acid (25 and 50 µM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with LPS control. LPS control.

유전적 접근을 통한 케미컬의 항염증 효능을 추가적으로 평가하였다.

새싹보리 유효 성분의 히스톤 아세틸기전달효소 활성 조절

후성유전적 조절을 통한 항염증 조절 메커니즘을 밝히기 위하여 활성 성분 5종의 히스톤 아세틸기전달효소 활성 조절을 평가하였다. 그 결과 luteolin의 *in vitro* HAT 활성 억제능이 가장 뛰어났다(Fig. 3). Luteolin은 25, 50 µM 처리 시 농도 의존적으로 HAT 활성을 억제하였으며($P < 0.05$), NE 대조군 대비 50% 이하로 HAT 활성을 억제시켰다. 본 연구에서는 NO 생성 억제 및 HAT 활성 억제능을 동시에 보인 luteolin을 활용하여 실험을 진행하였다.

HAT와 histone deacetylases(HDACs)는 세포 내 아세틸화를 조절하는 주요한 두 가지 효소이다. 아세틸기전달효소 p300과 CBP는 transcriptional coactivator로써 크로마틴 리모델링 등을 통하여 transcription의 활성을 조절한다. 특정 단백질의 아세틸화는 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 전사인자 NRF2는 스트레스로부터 세포를 보호하고, 세포 항상성을 유지시켜 주는 역할을 한다. p300 HAT는 NRF2와의 상호작용을 통하여 NRF2-KEAP1 복합체 형성을 방해하며, 그 결과 NRF2는 핵 내 이동하여 항염증 인자의 전사를 촉진시킨다. 종합적으로 p300은 NRF2 단백질 발현 및 안정성을 증대시키고, 핵내 translocation 및 전사 활성을 증대시킨다(Ganner 등, 2020). 반면 p300은 암세포에서 발현이 증대하는데, p300의 과발현은 여러 염증성 매개체에 의한 COX-2의 발현을 증대시킨다(Deng 등, 2003). p300 HAT는 히스톤의 아세틸화를 유도하여 크로마틴 구조를 느슨하게 만들어 NF-κB 등을 포함하는 여러 transactivators의 접근 및 결합 등을 용이하게 만든다(Deng 등, 2003; Deng 등, 2004). p300 HAT는 COX-2 프로모터 활성을 억제시키며, 이는 p300 HAT 억제가 COX-2 매개 여러 염증반응을 완화시킨다는 결과를 통하여 알 수 있다(Deng 등, 2003; Deng 등, 2004). Xiao 등(2011)의 연구에 의하면 퀴세틴은 p300 HAT 억제제로써 COX-2 프로모터에 여러 transactivator의 결합을 방해하고 COX-2 발현을 억제하

여 염증반응을 완화시킨다.

RAW264.7 세포에서 luteolin의 LPS로 유도된 염증반응 조절

Luteolin의 항염증 효능을 확인하기 위하여 RAW264.7 세포에 LPS 100 ng/mL를 처리하여 염증반응을 유도하고, NO, 사이토카인 레벨 및 염증매개인자 iNOS와 COX-2의 발현을 측정하였다. MTT assay(Fig. 2A) 및 WST-1 assay(Fig. 4A) 수행 결과에 따라 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(50 µM; 80% 세포 생존율 유지)까지 luteolin을 처리하여 NO 생성을 측정하였다. 그 결과 luteolin 10, 25, 50 µM은 농도 의존적으로 LPS에 의해 증가한 NO 생성을 억제했으며, 이는 통계적으로 유의하였다($P < 0.05$; Fig. 4B). 또한 염증성 사이토카인 IL-6와 TNF-α는 LPS 처리에 의하여 증가했으며, luteolin은 IL-6 함량을 농도 의존적 및 유의적으로 감소시켰다($P < 0.05$; Fig. 4C). Luteolin은 TNF-α 레벨을 감소시켰지만 이는 농도 의존적이지 않았고, 고농도 luteolin(50 µM) 처리는 TNF-α 레벨을 유의적으로 감소시켰다($P < 0.05$; Fig. 4D). 또한, luteolin은 LPS에 의해 증가한 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 현저히 감소시켰다(Fig. 4E).

RAW264.7 세포에서 LPS의 처리는 NO 생성과 염증성 사이토카인 분비를 증가시키는데 이 과정에서 전사인자인 NF-κB가 주요하게 관여한다. p65의 핵 내 이동으로 ILs, COX-2, iNOS 등 하위 조절 유전자의 발현이 증가하고 단백질 발현 또한 증가하게 된다. RAW264.7 세포에 LPS를 처리하고 24시간 후 염증 인자뿐 아니라 후성유전 조절 주요 마커인 p300, pcaf, CBP의 유전자 및 단백질 발현이 증가하였다. 또한, LPS 처리는 특정 히스톤 H3K9, H4K8, K4K12, H4K15 등의 아세틸화를 증가시켰다(Kim 등, 2019). 특히, p65의 핵 내 이동은 p65의 라이신 잔기(K) 310의 아세틸화에 영향을 받는데(Choi 등, 2009a), LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 p65의 K310의 아세틸화는 증가하며, 이는 나아가 NF-κB의 핵 내 이동을 증가시켜 염증성 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현을 증가시키게 된다(Kim 등, 2019).

Fig. 4. Cell viability (A), nitric oxide (NO) production (B), interleukin (IL)-6 level (C), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) level (D) regulated by luteolin in RAW264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL). Protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) regulated by luteolin and LPS was measured in RAW264.7 cells (E). *** P <0.001 compared with LPS control.

루테올린의 히스톤 아세틸기전달효소 활성 조절

Cell free 상태에서 루테올린에 의한 total HAT 및 p300, CBP, PCAF를 HAT의 활성 조절을 평가하고, 이를 상대적으로 계산하였다. 루테올린 0.1~100 μ M 처리는 total HAT, p300, CBP, PCAF의 활성을 농도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 5A~D). 특히, total HAT의 IC₅₀은 48.57 μ M이었다. 이를 통하여 루테올린은 HAT 활성 억제제로서 작용함을 알 수 있었다.

갈릭산(Choi 등, 2009b), 곰취(Kim 등, 2019) 등은 HAT 활성 억제를 통하여 LPS에 의해 유도된 염증반응을 억제시킨다. Luteolin의 항염증은 NF- κ B 조절 기전을 포함한 다양한 기전을 통해 이루어진다. 본 연구에서는 항염증 효능이 알려진 luteolin의 HAT 활성 억제를 통한 염증반응 완화에 대한 연구를 진행하였고, luteolin의 *in vitro* HAT 활성 억제 효능은 뛰어났다. 본 연구에서는 total HAT뿐만 아니라 p300, pCAF, CBP 활성의 유의적, 농도 의존적 억제제로서 luteolin의 항염증 효능을 최초 제시하고 있다.

RAW264.7 세포에서 루테올린의 히스톤 아세틸기전달효소 활성 억제

LPS로 염증반응을 유도한 RAW264.7 마우스 대식세포에서 핵을 추출하여 luteolin에 의한 핵 내 HAT 활성 조절을

평가하였다. 그 결과 LPS 100 ng/mL 처리는 유의적으로 total HAT 활성을 증가시켰고, 이는 50 μ M luteolin 처리에 의하여 유의적으로 억제되었다(Fig. 6A). 핵과 cytosol에 존재하는 단백질(HDAC1, α -tubulin)의 발현 정도를 western blot으로 평가하여 핵과 cytosol의 분리가 잘 이루어졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 6B).

염증반응 조절에서 p300, nrf2 등 주요 전사인자들의 활성에 관여하는 히스톤 아세틸기전달효소의 역할은 중요하며, 식품소재 및 주요 활성 성분들의 후성유전적 조절을 통한 항염증 연구는 종종 이루어져 왔다. 본 연구를 통하여 luteolin은 HAT 활성 억제를 통하여 LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 마우스 대식세포에서 염증성 매개인자(IL-6, TNF- α , iNOS, COX-2)의 발현을 감소시켰다. 새싹보리에서 관찰된 항염증 효능은 luteolin의 HAT 억제를 통한 항염증 효능에 기인한다고 할 수 있겠다.

요약

새싹보리의 항염증 효능을 확인하기 위하여 RAW264.7 마우스 대식세포에서 LPS에 의한 NO 생성 억제 정도를 평가하였다. BSP, BSE, BSW 중 BSE와 BSW가 cell viability에 영향을 미치지 않는 농도에서 NO 생성을 억제하였다. 새싹

Fig. 5. *In vitro* total histone acetyltransferase (HAT) activity regulated by luteolin was measured, and IC_{50} was calculated (A). Dose-dependent inhibitions of p300 (B), CBP (C), and PCAF (D) by luteolin (0.1~100 μM) were evaluated.

Fig. 6. Histone acetyltransferase (HAT) activity regulated by luteolin (25, 50 μM) was measured using nuclear of RAW264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL) (A). Nuclear and cytosol was fractionated from RAW264.7 cells treated with luteolin and LPS, and HDAC1 and α-tubulin proteins expression was measured in nuclear and cytosol fractions, respectively (B). * $P < 0.05$ compared with LPS control.

보리 열수 및 에탄올 추출물 모두 항염증 효능이 있음을 확인하였다. 새싹보리의 주요 활성 성분 중 luteolin의 NO 생성 및 *in vitro* HAT 활성 억제능이 다른 성분들보다 뛰어났

다. LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 세포에서 luteolin은 염증매개인자(IL-6, TNF-α, iNOS, COX-2)의 발현을 감소시켰다. Luteolin의 total 및 specific HAT 활성 조

절 정도를 평가하였는데, total HAT 활성에 있어서 luteolin의 IC₅₀은 48.57 µM이었다. Luteolin은 또한 저농도 처리 (0.1 µM)에서부터 p300, CBP, PCAF의 활성을 현저하게 감소시켰다. Luteolin의 HAT 활성 억제능은 LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 세포의 핵 내에서도 동일하게 관찰되었다. Luteolin의 항염증 효능은 HAT 활성 억제와 연관이 있으며, 새싹보리에서 관찰된 항염증 효능은 luteolin의 HAT 억제를 통한 항염증 효능에 기인한다고 할 수 있겠다.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 사업연구비(과제번호 E-0210601-01)의 지원을 받아 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Aborus NE, Čanadanović-Brunet J, Četković G, Šaponjac VT, Vulić J, Nebojša I. Powdered barley sprouts: composition, functionality and polyphenol digestibility. *Int J Food Sci Technol*. 2017. 52:231-238.
- Benedet JA, Umeda H, Shibamoto T. Antioxidant activity of flavonoids isolated from young green barley leaves toward biological lipid samples. *J Agric Food Chem*. 2007. 55:5499-5504.
- Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. *Nat Immunol*. 2011. 12:715-723.
- Byun AR, Chun H, Lee J, Lee SW, Lee HS, Shim KW. Effects of a dietary supplement with barley sprout extract on blood cholesterol metabolism. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015. 2015:473056. <https://doi.org/10.1155/2015/473056>
- Choi JH, Jung JG, Kim JE, Bang MA. Anti-melanogenic effects of *Hordeum vulgare* L. barely sprout extract in murine B16 F10 melanoma cells. *J Nutr Health*. 2019. 52:168-175.
- Choi KC, Jung MG, Lee YH, Yoon JC, Kwon SH, Kang HB, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation. *Cancer Res*. 2009a. 69:583-592.
- Choi KC, Lee YH, Jung MG, Kwon SH, Kim MJ, Jun WJ, et al. Gallic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nuclear factor-κB signaling by preventing RelA acetylation in A549 lung cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2009b. 7:2011-2021.
- Deng WG, Zhu Y, Wu KK. Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood*. 2004. 103:2135-2142.
- Deng WG, Zhu Y, Wu KK. Up-regulation of p300 binding and p50 acetylation in tumor necrosis factor-α-induced cyclooxygenase-2 promoter activation. *J Biol Chem*. 2003. 278:4770-4777.
- Dong J, Xu O, Wang J, Shan C, Rean X. Luteolin ameliorates inflammation and Th1/Th2 imbalance via regulating the TLR4/NF-κB pathway in allergic rhinitis rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2021. 43:319-327.
- Donkor ON, Stojanovska L, Ginn P, Ashton J, Vasiljevic T. Germinated grains—sources of bioactive compounds. *Food Chem*. 2012. 135:950-959.
- Ganner A, Pfeiffer ZC, Wingendorf L, Kreis S, Klein M, Walz G, et al. The acetyltransferase p300 regulates NRF2 stability and localization. *Biochem Biophys Res Comm*. 2020. 524:895-902.
- Guo C, Yang L, Wan CX, Xia YZ, Zhang C, Chen MH, et al. Anti-neuroinflammatory effect of Sophoraflavanone G from *Sophora alopecuroides* in LPS-activated BV2 microglia by MAPK, JAK/STAT and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Phytomedicine*. 2016. 23:1629-1637.
- Idehen E, Tang Y, Sang S. Bioactive phytochemicals in barley. *J Food Drug Anal*. 2017. 25:148-161.
- Islam MZ, Yu DS, Lee YT. The effect of heat processing on chemical composition and antioxidative activity of tea made from barley sprouts and wheat sprouts. *J Food Sci*. 2019. 84:1340-1345.
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*. 2003. 24:25-29.
- Kim CH, Lee MA, Kim TW, Jang JY, Kim HJ. Anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* root methanol extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012. 41:1645-1648.
- Kim HJ, Choi HK, Chung MY, Park JH, Chung S, Lee SH, et al. Ethanol extract of *Ligularia fischeri* inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response by exerting anti-histone acetyltransferase activity to negatively regulate p65. *J Med Food*. 2019. 22:1127-1135.
- Lahouar L, El-Bok S, Achour L. Therapeutic potential of young green barley leaves in prevention and treatment of chronic diseases: an overview. *Am J Chin Med*. 2015. 43:1311-1329.
- Lee YH, Kim JH, Kim SH, Oh JY, Seo WD, Kim KM, et al. Barley sprouts extract attenuates alcoholic fatty liver injury in mice by reducing inflammatory response. *Nutrients*. 2016. 8:440. <https://doi.org/10.3390/nu8070440>
- López-Lázaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem*. 2009. 9:31-59.
- McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996. 211:24-32.
- Pajak P, Socha R, Galkowska D, Roznowski J, Fortuna T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chem*. 2014. 143:300-306.
- Park EJ, Kim YM, Kim HJ, Chang KC. Luteolin activates ERK1/2- and Ca²⁺-dependent HO-1 induction that reduces LPS-induced HMGB1, iNOS/NO, and COX-2 expression in RAW 264.7 cells and mitigates acute lung injury of endotoxin mice. *Inflamm Res*. 2018. 67:445-453.
- Plaza L, de Ancos B, Cano PM. Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *Eur Food Res Technol*. 2003. 216:138-144.
- Pu Y, Yang Z, Mo X. Protective effect of luteolin on D-galactosamine (D-Gal)/lipopolysaccharide (LPS) induced hepatic injury by in mice. *Biomed Res Int*. 2021. Article ID 2252705. <https://doi.org/10.1155/2021/2252705>
- Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, et al. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-β-glucoside in rats and humans. *FEBS Letters*. 1998. 438:220-224.
- Vale AP, Cidade H, Pinto M, Oliveira MB. Effect of sprouting and light cycle on antioxidant activity of *Brassica oleracea* varieties. *Food Chem*. 2014. 165:379-387.
- Wang X, Gai YN, Li BB, Huang LL. Andalusin from *Artemisia lannta* suppresses the neuroinflammation via the promotion of Nrf2-mediated HO-1 levels by blocking the p65-p300 in-

- teraction in LPS-activated BV2 microglia. *Phytomedicine*. 2018. 41:226-232.
- Wang XG, Chen, GY, Chen MP. Effect of luteolin on COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-induced RAW264.7 cells. *Zhong Yao Cai*. 2007. 30:1263-1266.
- Wardyn J, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans*. 2015. 43:621-626.
- Xiao X, Shi D, Liu L, Wang J, Xie X, Kang T, et al. Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of p300 signaling. *PLoS One*. 2011. 6: e22934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022934>
- Zhang ZH, Yang HX, Jin Q, Wu YL, Cui ZY, Shang Y, et al. Luteolin attenuates hepatic injury in septic mice by regulating P2X7R-based HMGB1 release. *Food Funct*. 2021. 12:10714-10727.
- Zheng Y, Pu X, Yang J, Du J, Yang X, Li X, et al. Preventive and therapeutic role of functional ingredients of barley grass for chronic diseases in human beings. *Oxid Med Cell Longev*. 2018. Article ID 3232080. <https://doi.org/10.1155/2018/3232080>