

## RAW 264.7 대식세포주에서 나노입자화 리코펜의 항염증 증진 효과\*

서은영<sup>1\*\*</sup> · 김명환<sup>2\*\*</sup> · 김우경<sup>3</sup> · 장문정<sup>4†</sup>

장안대학교 외식산업과,<sup>1</sup> 단국대학교 식품공학과,<sup>2</sup> 단국대학교 식품영양학과,<sup>3</sup> 국민대학교 식품영양학과<sup>4</sup>

## Comparing the anti-inflammatory effect of nanoencapsulated lycopene and lycopene on RAW 264.7 macrophage cell line\*

Seo, Eun Young<sup>1</sup> · Kim, Myung Hwan<sup>2</sup> · Kim, Woo-Kyoung<sup>3</sup> · Chang, Moon-Jeong<sup>4†</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Service Industry, Jangan University, Hwaseong 18331, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Technology, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

<sup>3</sup>Department of Food & Nutrition, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

<sup>4</sup>Department of Food & Nutrition, Kookmin University, Seoul 02707, Korea

### ABSTRACT

**Purpose:** We developed a method to load lycopene into maltodextrin and cyclodextrin in an attempt to overcome the poor bioavailability and improve the anti-inflammatory effect of this polyphenol. **Methods:** Nanosized lycopenes were encapsulated into biodegradable amphiphilic cyclodextrin and maltodextrin molecules prepared using a high pressure homogenizer at 15,000~25,000 psi. Cell damage was induced by lipopolysaccharides (LPS) in a mouse macrophage cell line, RAW 264.7. The cells were subjected to various doses of free lycopene (FL) and nanoencapsulated lycopene (NEL). RT-PCR was used to quantify the tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA levels, while ELISA was used to determine the protein levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6. **Results:** NEL significantly reduced the mRNA expression of IL-6 and IL-1 $\beta$  at the highest dose, while not in cells treated with FL. In addition, NEL treatment caused a significant reduction in IL-6 and TNF- $\alpha$  protein levels, compared to cells treated with a similar dose of FL. In addition, mRNA expression of iNOS and COX-2 enzyme in the activated macrophages was more efficiently suppressed by NEL than by FL. **Conclusion:** Overall, our results suggest that lycopene is a potential inflammation reducing agent and nanoencapsulation of lycopene can further improve its anti-inflammatory effect during tissue-damaging inflammatory conditions.

**KEY WORDS:** lycopene, nanoencapsulated lycopene, anti-inflammation, RAW 264.7 cells

### 서 론

리코펜은 항산화능력이 가장 우수한 카로티노이드로 만성 퇴행성 질환을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 토마토와 토마토를 이용한 가공식품에 다량 함유되어 있다.<sup>1,2</sup> Stahl과 Sies는 리코펜이 세포간의 상호작용과 세포성장을 조절한다고 보고하였으며,<sup>3</sup> 역학조사에서 토마토의 섭취량이 컸을 때 전립선암과 폐암의 위험도를 낮추었으며, 심혈관계 질환을 예방하는 효과가 있다고 보고되어, 리코펜이 풍부한 식품이 건강에 유익함을 보고해왔

다.<sup>2,4</sup> 임상영양중재연구에서도 토마토나 리코펜을 전립선 암 환자에게 제공하였을 때 DNA 손상 및 종양수 감소, 세포사멸 증가, 혈중 전립선 특이성 항원농도 감소효과가 있었다고 보고되었다.<sup>5-8</sup> 리코펜은 독성이 매우 낮아 실험쥐에게 1일 500 mg/kg bw를 14주간 경구투여하였을 때, 또 다른연구에서 1,000 mg/kg bw의 용량으로 4주간 섭취시켰을 때 독성을 나타내지 않았고, 인체에서도 식사를 통한 리코펜의 섭취는 안전한 것으로 알려져 있다.<sup>9</sup>

리코펜은 물에 불용이며, 지용성임에도 불구하고 유지에서 용해도가 매우 낮아 실온상태의 식용유에 0.2 g/L

Received: November 25, 2015 / Revised: December 7, 2015 / Accepted: December 14, 2015

\*This research was supported by 2014 Ottogi foundation research program.

\*\*These two authors contributed to this work equally.

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-910-4776, e-mail: cmoon@kookmin.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

정도 용해된다.<sup>10</sup> 카로티노이드의 생체 이용율은 다양한 요인에 의해 영향을 받는 데 그 중 물리적으로 생과일이나 채소의 카로티노이드는 결정구조로 인해 극히 일부만 흡수되는데, 리코펜도 결정구조를 갖고 있어서 생체이용율이 극히 낮은 것으로 알려져 있다.<sup>11</sup> McClain과 Bausch는 실험쥐와 원숭이를 이용한 리코펜의 흡수, 분포, 대사 및 배설 연구에서 리코펜의 흡수율은 약 8.7%였으며, 흡수된 후 44%가 소변으로, 20%는 담즙으로, 13%는 호기로 배설되고, 섭취 후 96시간 후에는 흡수된 리코펜의 약 24% 정도가 조직이나 기관에 잔존한다고 보고하였다.<sup>9</sup> 따라서 리코펜의 건강증진효과는 낮은 수용성용해도와 생체이용율로 인해 제한적일 뿐 아니라 체내 흡수되어 분해 및 배설이 빠르게 일어나 그 효과가 더 감소될 가능성이 크다고 할 수 있다. 뿐만 아니라 가공처리나 저장과정에서 안정성이 취약하며 열, 산소 및 빛 등에 의하여 all-trans isomer가 분해되거나 cis-isomer로 전환되고 cis형은 옹집경향이 적어 결정을 형성하게 되어 생체 이용성이 더 낮아진다.<sup>12-15</sup>

식품 내 생리활성물질의 물에 대한 용해도, 또는 생체이용성을 증진시키기 위해 유화, 화학구조의 변경, 미세캡슐화 등 시도가 많이 진행되어 왔다. 물질은 나노미터 ( $10^{-9}$  m) 단위에서 인체에 쉽게 흡수될 수 있기 때문에 생체이용율이 높아지며, 흡수 후 각기 다른 신체부위로 전달되며 특히 100 nm 이하가 되면 세포에 대한 친화성이 더욱 증가한다.<sup>16</sup> 나노입자의 크기로 감소시킨 생리활성물질을 코어(core)로 하여 미셀 형태로 캡슐화시키는 것은 생리활성물질의 저장 안정성을 증가시킬 수 있는 또 다른 시도이다.<sup>17,18</sup> 생리활성물질의 미셀구조형성을 위한 캡슐화는 양성 고분자물(amphiphilic polymer)에 의해 이루어지며, 캡슐화후 생리활성물질의 안정성에 영향을 줄 수 있는 빛, 산소, 수분 등의 외부환경요인으로 부터 보호할 수 있다.<sup>19,20</sup> 또한, 캡슐화는 미세한 고체입자나 액체에 폴리머 초박형 필름을 코팅하는 과정으로 생리활성성분을 trap하여 통제된 조건하에 이 성분들을 방출하는 데 사용되는 방법으로 주로 아미노산, 비타민, 무기질, 항산화물질, 색소, 효소, 감미료등에 적용되어 그 생리적 효능을 크게 향상시키는 데 사용되고 있다. Wang 등은 용해도가 낮은 커큐민(curcumin)을 수중유형 나노유화시스템(O/W)을 사용하여 유화시켜 항염증효과를 유의적으로 개선하였으며,<sup>21</sup> Tomren 등은 cyclodextrin을 이용하여 미셀형태로 캡슐화시켜 물에 대한 용해도를 높였다고 보고하였다.<sup>22</sup> 또한 Desai 등은 실험쥐에서 bovine serum albumin을 나노와 마이크로 크기로 입자크기를 감소시킨 후 캡슐화시켰을 때 실험쥐의 장세포에서 나노캡슐화된 bovine serum albumin의 흡수율이 마이크로 크기로 캡슐화시켰을 때 비해

10,000~100,000 배 증가하였다고 보고하였다.<sup>23</sup>

본 연구에서는 나노입자화하여 식품급 양성 물질로 캡슐화시킨 리코펜(nanoencapsulated lycopene, NEL)과 일반 리코펜(free lycopene, FL)의 항염 활성효과를 비교하고자 하였다.

## 연구방법

### 리코펜 시료의 준비

본 실험에 사용된 리코펜은 충북 청원군에서 수확한 완숙 토마토 ((주)옥산농업협동조합)를 천안 농수산물 시장에서 구입하여 추출하였다. 분석에 사용한 모든 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA)의 HPLC grade를 구입하였고 리코펜 함량 분석에 사용된 표준물질은 fluka chemical (Buchs, Switzerland)의 HPLC grade시약을 구입하였다. 캡슐화에 사용한 피복물질인 maltodextrin과 cyclodextrin은 각각 MD-1520 (친황다오리카스타치, China)와 싸이텍스-S (대상주식회사, Korea)를 구입하여 사용하였다.

### 토마토 리코펜의 추출 및 정제 공정

껍질과 씨를 제거하여 균질화 시킨 토마토 100 g을 ethyl acetate 100 mL를 가하여 10분간 교반시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 (UNION55R, Hanil Science Industrial Co. Ltd, Korea)를 하여 상등액만 분리한 다음 수세를 여러 번 하고 sodium sulfate로 수분을 제거하여 추출용액을 얻었다. 추출된 리코펜의 정제 과정은 추출용액을 pH 4.8로 맞추고 Celluclast<sup>®</sup> 1.5L FG (Novozymes, Denmark)를 첨가하여 25°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 column chromatography 방법을 이용하였다. 이때, column의 충전제로 HP20 (IONTEC)을 사용하였다. 효소농도와 ethanol 농도 변화에 따라서 정제된 용액은 진공회전농축기 (BUCHI rotavapor R-124 and BUCHI water bath B-480, Flawil, Switzerland)를 사용하여 40°C에서 감압농축한 후 시료로 사용하였다.

### 나노 캡슐화 공정

추출 정제된 리코펜을 동결건조기 (SFDSM24L, Samwon Freezing Engineering Co., Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 분말화 하였다. 캡슐화는 핵물질로 정제된 리코펜을 사용하였고 피복물질로는 maltodextrin과 cyclodextrin을 1:1 비율로 이용하였다. 나노 입자 및 캡슐의 제조는 1:1의 maltodextrin과 cyclodextrin에 증류수를 첨가해 수화시킨 후, high pressure homogenizer (EF-C3)

이용하여 처리압력 (X1: 15,000~25,000 psi)과 반복횟수 (X2: 1-3회)를 달리하여 균질화시켜 유화액을 제조하였다. 이 때 핵물질과 피복물질의 비는 1 : 4로 하였다. 나노 입자 및 캡슐화는 nano size filtering을 하였으며 균질화시킨 유화액을 동결건조 하여 분말로 제조한 후 시료로 사용하였다.

### 세포배양

실험에 사용된 세포는 RAW 264.7 대식세포주였으며, 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포는 습윤한 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (WelGENE, Korea)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F12) (WelGENE, Daegu, Korea)에서 배양하였다. 세포가 60~70% 정도 dish를 덮으면 phosphate buffered saline solution (PBS)로 2번 씻어내고 trypsin-EDTA (WelGENE, Korea)를 처리하여 세포를 모은 후 계대 배양하고 media는 2~3일마다 교환하였다. 염증 유도 물질로는 *Escherichia coli*에서 유래한 lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 일란리코펜 (free lycopene, FL)과 나노캡슐화리코펜 (nanoencapsulated lycopene, NEL)은 dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 3차 증류수 2가지를 사용하여 각각 100 mg/mL 농도로 stock을 만들어 사용하였다.

### 세포증식

FL과 NEL의 첨가 농도 증가에 따른 세포의 성장을 알아보기 위해 24 well plate에  $2.0 \times 10^4$  cells/mL의 농도로 분주하고, 48시간 후에 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium (SFM, 0.1% BSA, 5 µg/mL transferrin, 5 ng/mL selenium, 1,000 units/mL penicillin, 1,000 µg/mL streptomycin, Gibco)으로 배양액을 교환하였다. 24시간 serum starvation 시킨 후, SFM에 FL 또는 NEL 각각 0, 5, 10, 20 µg/mL 함유된 배양액으로 교환하였다. 배양 후 0, 12, 24, 48시간이 경과한 후 MTT assay 방법으로 세포 증식 정도를 측정하였다.

### 분석방법

#### MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma)를 1 mg/mL의 농도로 well 당 1 mL씩 넣

고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 3시간 incubation 시킨 후 iso-propanol 0.5 mL에 용해시킨 다음 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였고, 이 자료를 근거로 하여 항염 효과를 위한 FL과 NEL 처리 농도를 0, 5, 10, 20 µg/mL로 결정하였다.

### 유전자의 mRNA 발현

항염증 관련 유전자의 mRNA 발현을 확인하기 위해 Real time quantitative PCR을 실시하였다. 항염증 관련 유전자로는 interleukin-1β (IL-1β), IL-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 관찰해보았고, house-keeping gene으로는 β-actin을 사용하였다. 실험을 위해 세포는 6 well plate에  $7 \times 10^4$  cells/mL의 농도로 plating하고, 24시간 후에 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후, FL, NEL을 0, 5, 10, 20 µg/mL 농도로 처리하여 배양하였다. FL, NEL 처리는 24시간마다 하였고 다시 24시간 후에 FL, NEL을 농도별로 처리한 세포는 배양액을 제거한 후 TRI reagent (Sigma)를 0.5 mL/well 넣어 RNA를 추출하였다. 0.2 mL의 chloroform을 넣어 4°C, 10,500 rpm에서 15분간 원심분리 하여 얻어진 상층액과 동량의 isopropanol을 넣은 후 상온에서 방치한 후 4°C, 10,500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 pallet은 70% ethanol로 세척한 후 충분히 건조시켰다. 건조시킨 pallet은 RNase-free dH<sub>2</sub>O/0.1 mM EDTA에 용해한 후 260 nm, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 OD260/OD280 ratio로 RNA의 purity를 알아보고 OD260 값으로 RNA를 정량하였다. 정량된 RNA, oligo DT, Depc water를 첨가하여 총량을 같게 한 후 70°C에서 10분간 incubation 하고 reaction buffer를 첨가하여 42°C에서 5분간 incubation한다. Superscript II reverse (Invitrogen, CA, USA)을 첨가하여 42°C에서 1시간 45분, 70°C에서 15분간 incubation하여 cDNA를 합성하였다. Detector로 SYBR green Master Mix (Applied biosystems, CA, USA) 10 µL, forward/reverse primer (Table 1) 각각 1 µL, Depc Water 6 µL을 넣어 Applied Biosystems StepOne (Applied biosystems, CA, USA) software v2.1을 사용하여 real time PCR을 수행하였다. Data는 Applied Biosystems StepOne (Applied biosystems) software v2.1에 내장되어 있는 프로그램을 이용하여  $\Delta\Delta$ CT 방법으로 분석하였으며, 3회 반복 실험하였다. 각 유전자의 Real time PCR을 위한 primer는 Table 1에 제시하였다.

**Table 1.** Primer sequences used for Real time PCR

Protein	Primer	Sequence
β-actin	Forward	5'-GTT TGA GAC CTT CAA CAC CCC-3'
	Reverse	5'-GTG GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC-3'
IL-1β	Forward	5'-TTG ACG GAC CCC AAA AGA T-3'
	Reverse	5'-GAA GCT GGA TGC TCT CAT CTG-3'
IL-6	Forward	5'-TTC ATT CTC TTT GCT CTT GAA TTA GA-3'
	Reverse	5'-GTC TGA CCT TTA GCT TCA AAT CCT-3'
TNF-α	Forward	5'-TCT CTT CAA GGG ACA AGG CTG-3'
	Reverse	5'-ATA GCA AAT CGG CTG ACG GT-3'
iNOS	Forward	5'-GAC CAG ATA AGG CAA GCA C-3'
	Reverse	5'-CTT GTC TTT GAC CCA GTA GC-3'
COX-2	Forward	5'-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'
	Reverse	5'-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3'

T: Thymine, A: Adenin, C: Cytosine, G: Guanine

### 사이토카인 농도측정

항염증 유전자의 분비량을 측정하기 위해 세포는 12 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 plating하고, 24시간 후에 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후, FL, NEL을 0, 5, 10, 20  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하여 배양하였다. FL, NEL처리는 24시간마다 하였고, 다시 24시간 후에 FL, NEL을 농도별로 처리한 세포 배양액을 얻어 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 mouse TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ELISA LEGEND MAXTM Kit는 Biolegend (San diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 통계처리

본 연구의 실험으로 얻어진 결과는 통계프로그램 SPSS

(SPSS ver18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준 편차로 계산되었고, 각 군 간의 차이는 ANOVA 분석 후  $\alpha = 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

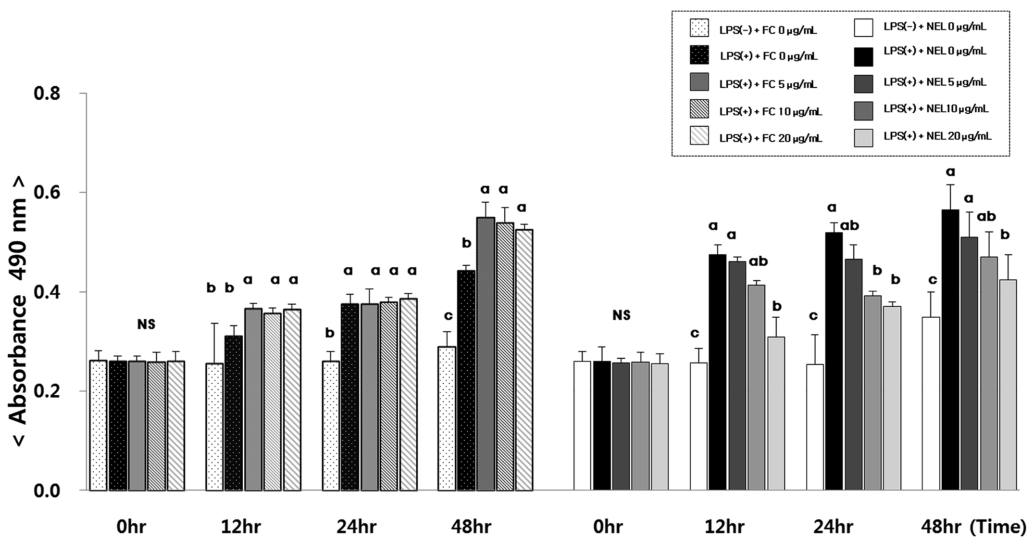
## 결 과

### 세포증식에 미치는 영향

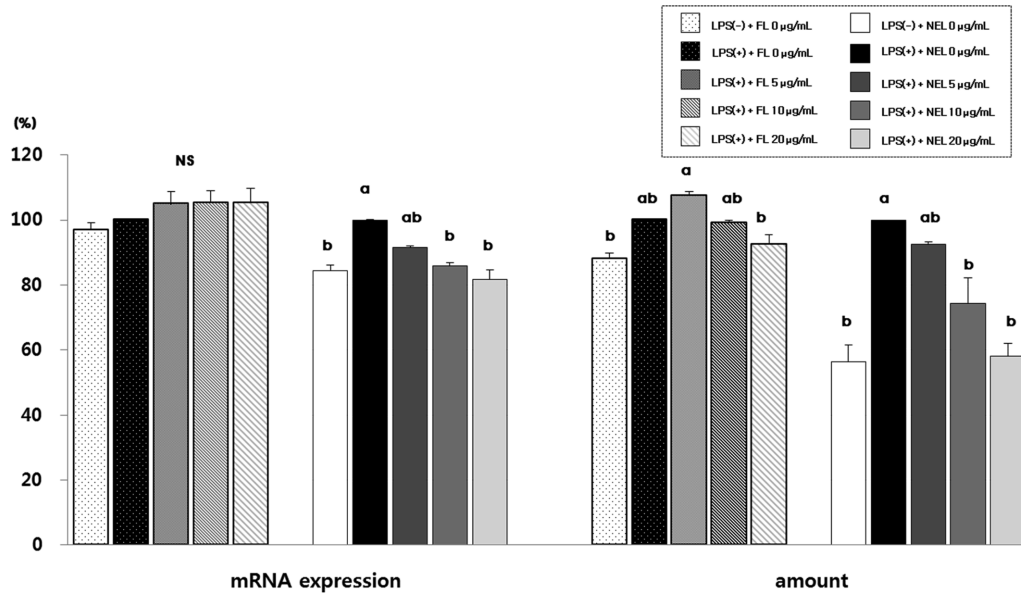
Fig. 1에 제시된 바와 같이 Raw264.7 세포를 0, 12, 24, 48시간 배양하였을 때 LPS 처리시 세포의 증식이 유의하게 증가하였으나 각 배양시간대에서 NEL 처리군의 경우 처리농도에 의존적으로 감소된 반면 FL 처리시 처리농도에 따른 염증세포 증식의 억제효과가 나타나지 않았다.

### 염증매개 사이토카인 mRNA유전자 발현 및 농도에 미치는 영향

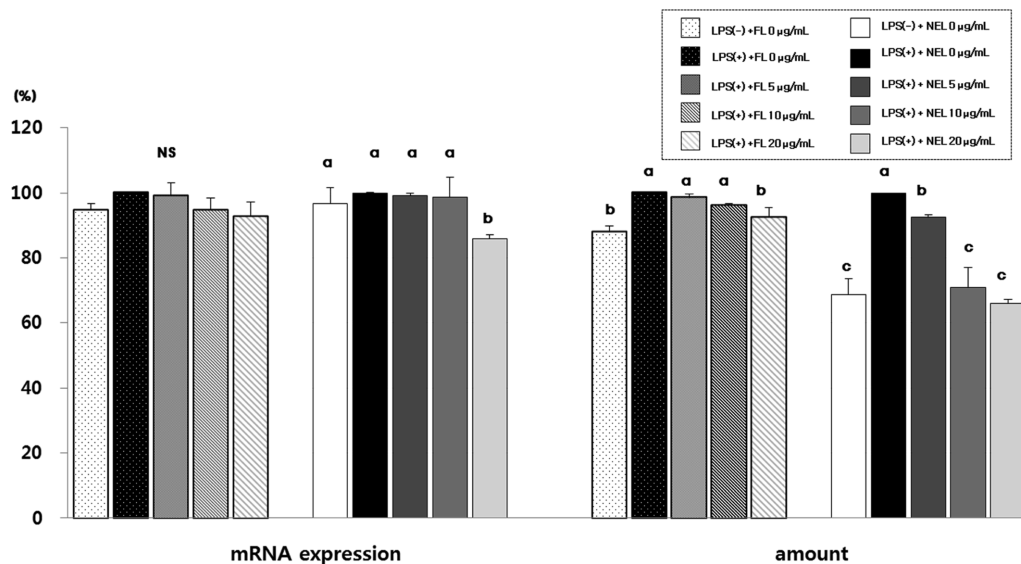
Fig. 2에 interleukin 6 (IL-6) mRNA 유전자 발현과 단백질 농도를 제시하였다. RAW264.7 대식세포주에서 NEL처리군은 LPS처리로 인해 촉진된 IL-6 mRNA 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하였으며, 10  $\mu\text{g/mL}$ 과 20  $\mu\text{g/mL}$  처리농도에서 LPS 처리군에 비해 통계적으로 유의하였으며 정상대조군 수준으로 억제되었다. IL-6 단백질 농도도 NEL 처리농도에 의존적으로 억제되었으며 10~20  $\mu\text{g/mL}$  처리 농도는 정상대조군의 수준이었다. LPS와 FL 처리시 IL-6 mRNA 유전자 발현에 영향을 주지 않았고, LPS처리하면서 FL의 처리농도가 20  $\mu\text{g/mL}$ 이었을 때 IL-6 단백질 농도가 통계적으로 유의하게 감소하였으나 NEL 처리에



**Fig. 1.** Effect of FL or NFL on cell proliferation in Raw264.7 cells. FL: free lycopene, NEL: nanoencapsulated lycopene. Values not sharing the same purperscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of lycopene treatment ( $p < 0.05$ ).



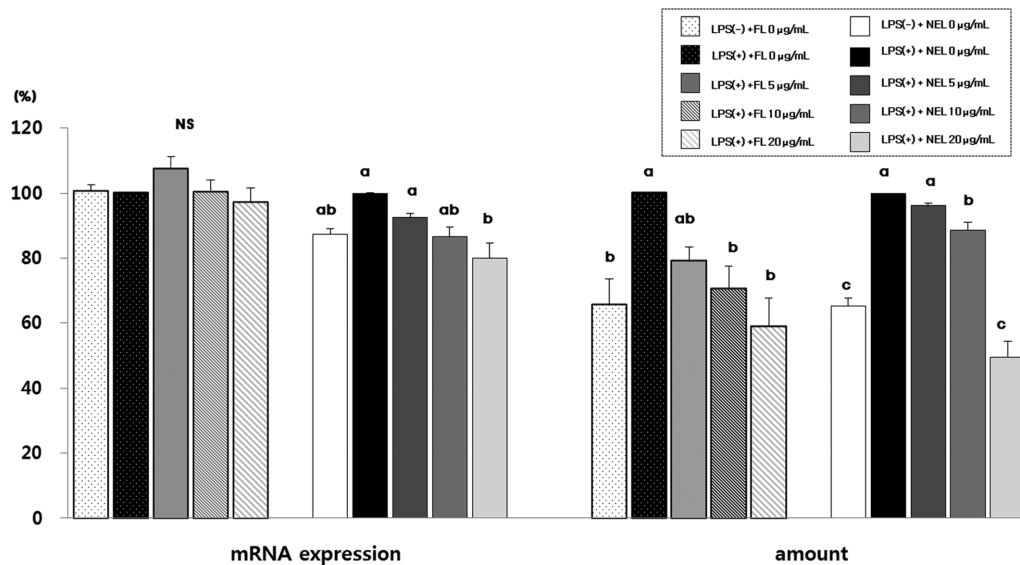
**Fig. 2.** Effect of FL or NFL on IL-6 mRNA expression and amount in Raw264.7 cells. FL: free lycopene, NEL: nanoencapsulated lycopene. Values not sharing the same purperscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of lycopene treatment ( $p < 0.05$ ).



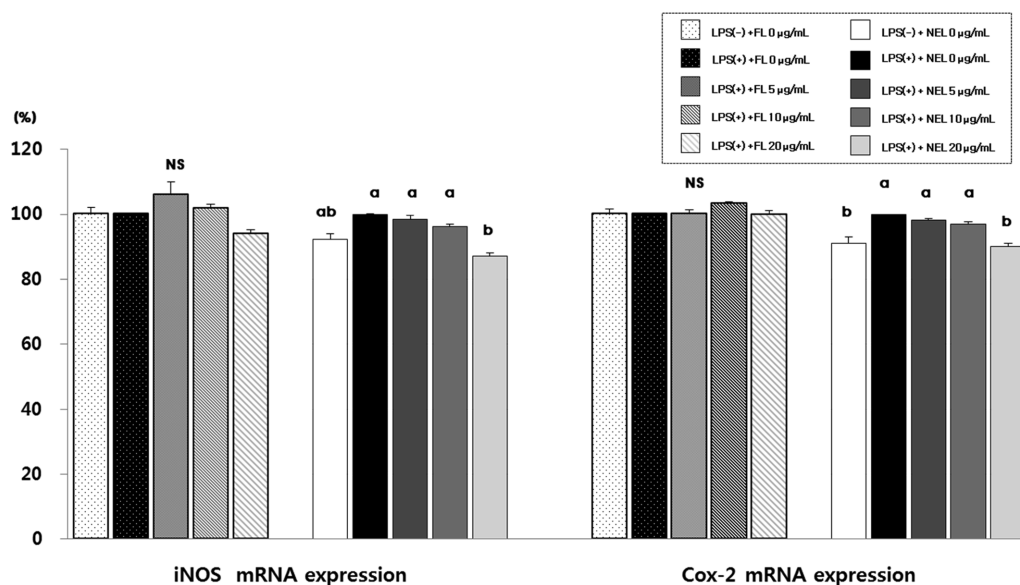
**Fig. 3.** Effect of FL or NFL on IL-1 $\beta$  mRNA expression and amount in Raw264.7 cells. FL: free lycopene, NEL: nanoencapsulated lycopene. Values not sharing the same purperscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of lycopene treatment ( $p < 0.05$ ).

서 IL-6 단백질 생성억제 효과가 더 컸다. Fig 3에 제시한 바와 같이 LPS와 FL 처리시 IL-1 $\beta$  mRNA 유전자 발현에 영향을 주지 않았으나, LPS로 염증을 유도하면서 NEL 처리시 20  $\mu\text{g/mL}$  처리 농도에서 통계적으로 유의하게 유전자 발현이 정상대조군보다 더 낮은 수준으로 감소되었다 ( $p < 0.05$ ). 그러나 IL-1 $\beta$  단백질 농도는 FL을 20  $\mu\text{g/mL}$  처리했을 때 감소하였고, NEL 처리구는 농도 의존적으로 감소하였다.

LPS 처리시 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현이 증가하였으며, LPS와 FL을 같이 처리하였을 경우 TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 통계적으로 유의적인 차이가 없었다. LPS와 NEL을 처리한 시험군의 경우 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  처리군에서 농도에 의존적으로 TNF- $\alpha$  유전자 발현이 감소하는 경향이었고, NEL 20  $\mu\text{g/mL}$  처리군의 유전자 발현이 가장 낮았다 (Fig. 4). LPS로 인해 TNF- $\alpha$  단백질 농도가 유의하게 증가하였으며, FL과 NEL 처리시 농도에 의존적으로 TNF- $\alpha$



**Fig. 4.** Effect of FL or NFL on TNF- $\alpha$  mRNA expression and amount in Raw264.7 cells. FL: free lycopene, NEL: nanoencapsulated lycopene. Values not sharing the same purperscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of lycopene treatment ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Effect of FL or NFL on iNOS and COX-2 mRNA expression and amount in Raw264.7 cells. FL: free lycopene, NEL: nanoencapsulated lycopene. Values not sharing the same purperscript letter are statistically different by Duncan's multiple range test in the same type of lycopene treatment ( $p < 0.05$ ).

단백질 농도가 유의하게 감소하였다. NEL을 20  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 시험군에서 가장 TNF- $\alpha$  농도가 낮았다.

#### Inducible nitric oxide synthase 및 cyclooxygenase-2 유전자 발현에 미치는 영향

Fig. 5에 제시한 바와 같이 iNOS mRNA 발현은 FL 10  $\mu\text{g/mL}$ 과 20  $\mu\text{g/mL}$  처리시 농도 의존적으로 감소하는 경향이었으나 NEL처리구에서는 20  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 통계

적으로 유의하게 감소하였다. COX-2 mRNA 유전자 발현은 FL에 의한 영향이 없었으며, NEL 처리는 농도에 의존적으로 감소하여 20  $\mu\text{g/mL}$  처리시 정상대조군 수준으로 감소하였다.

#### 고 찰

토마토는 항염증효과가 있는 생리활성물질들을 함유하



고 있으며 그 중 가장 많이 들어 있는 성분은 리코펜이다.<sup>24</sup> 또한 리코펜은 토마토 외에도 자몽 등과 같은 다양한 과일과 채소에 함유되어 있다. 리코펜은 강력한 항산화기능, 항암, 항염증 등의 건강상 유익한 특성을 갖고 있으나 물에 불용인 물질로 일반적으로 경구로 섭취하기 때문에 낮은 생체 이용률을 나타낸다.

염증반응은 활성산소종 (reactive oxygen species), 염증성 사이토카인 또는 항염증성 사이토카인 생성, 전사인자 (transcription factor)와 adhesion molecule의 up regulation 등이 관여하는 생물학적 반응이다.<sup>25</sup> 활성산소종은 지질과산화물을 형성하고, 이 물질은 다시 활성산소종 생성을 촉진시키고, 염증자극성 전사인자를 활성화시켜 염증반응을 자극하게 된다. 만일 지질과산화반응과 염증반응이 제어되지 않을 경우 만성 염증성 반응으로 진행되며, 만성적인 염증은 심혈관계 질환과 뇌졸중의 위험도를 증가시키고, 암, 당뇨, 비만 등의 유발과 진행을 촉진하는 요인으로 알려져 있다.<sup>26</sup>

최근 NF- $\kappa$ B가 만성 염증성 질환유발의 유발인자로 작용한다고 보고되었는데,<sup>27</sup> NF- $\kappa$ B는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , LPS 등에 의해 생성이 촉진된다.<sup>28,29</sup> IL-1 $\beta$ , IL-6, LPS와 같은 만성 염증 유발인자는 다른 사이토카인, chemokines과 같은 염증성 유전인자의 발현을 자극하는 중심적인 역할을 하여 adhesion molecules, iNOS, COX-2와 같은 염증유발 유전자 발현을 촉진한다. NOS 족에는 iNOS와 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS)가 있는데 nNOS, eNOS는 다양한 환경조건에서 일정하게 발현되는데 비해 iNOS는 사이토카인, 바이러스, LPS 등과 같은 자극에 의해 유전자 발현이 유도되어, 대량으로 nitric oxide (NO)를 생성한다. NO 농도의 증가는 세포증식, 침식의 원인이 되고,<sup>30</sup> 일부 조직이나 신체 전반에 걸친 염증질환을 유발한다.<sup>31</sup> COX-2는 또 다른 염증 매개체인 prostaglandin E2 (PGE2)의 생성을 자극한다.<sup>32,33</sup>

RAW264.7 세포주는 활성산소종에 의한 손상으로 유발된 염증반응을 촉진하는 사이토카인과 같은 매개체를 생성하기 때문에 생리활성물질이 염증반응에 미치는 영향을 연구하는 데 많이 활용되고 있다. 리코펜은 매우 소수성인 물질이어서 생체이용률이 낮은 문제를 갖고 있으므로 본 연구에서는 나노캡슐화를 적용하여 리코펜의 낮은 생체이용률을 개선하고 생리활성을 안정화시켜 항염증반응의 효과를 개선할 수 있는 지 여부를 평가하기 위해 시도되었다. 본 연구에서 RAW 264.7 대식세포주를 이용한 리코펜과 나노캡슐화리코펜 비교 실험에서 LPS로 염증반응을 유도후 비캡슐화 상태의 FL첨가시 IL-6와 IL-1 $\beta$  mRNA 유전자 발현은 유의적인 차이가 없었으나 세포내 IL-6 농

도와 IL-1 $\beta$  단백질 농도가 감소되었다. 그러나 나노캡슐화된 리코펜은 LPS 처리로 인해 증가된 IL-6 및 IL-1 $\beta$  mRNA 유전자 발현 및 세포내 농도를 리코펜 처리농도에 의존적으로 유의하게 감소시켜 미캡슐화 리코펜에 비해 더 효과적으로 IL-6 생성을 억제하였다. LPS 처리시 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현이 증가하는 경향이었고 LPS와 리코펜을 같이 처리하였을 때 mRNA 발현이 리코펜 처리 농도에 의존적으로 감소하는 경향이었으나 통계적인 유의성은 없었던 반면, 나노캡슐화 된 리코펜은 LPS로 유도한 TNF- $\alpha$  mRNA 유전자 발현을 농도에 의존적으로 억제하였다 ( $p < 0.05$ ). 세포내 TNF- $\alpha$  단백질의 농도는 LPS로 유도시 증가하였으며, 미캡슐화 리코펜과 나노캡슐화리코펜 처리 시험구 모두 농도에 의존적으로 단백질 농도 생성을 억제하였다. 나노캡슐화 리코펜 처리농도가 높았던 20  $\mu$ g/mL 군에서 가장 TNF- $\alpha$  농도가 낮았다. 따라서 일반 리코펜은 나노캡슐화 리코펜과 동일한 조건에서 처리시 사이토카인 단백질 농도 생성은 저하시키나 유전자 발현을 억제하는 효과는 나타나지 않았다. 반면 나노캡슐화 리코펜은 사이토카인의 mRNA 유전자 발현 및 농도를 감소시키는 데 효과적이었음을 알 수 있었다.

COX-2의 유전자 발현도 리코펜 처리구보다 나노캡슐화 리코펜 처리구에서 처리농도에 의존적으로 유전자 발현이 억제되고, 20  $\mu$ g/mL 이상 처리구는 LPS 처리로 인한 유전자 발현 증가를 정상대조군과 같은 수준으로 억제시켰다. COX-2는 정상적인 생리조건에서는 매우 낮으나 사이토카인, endotoxin, 성장인자, oncogene과 같은 염증유발성 자극에 의해 빠르게 활성이 증가하고 다양한 암에서 COX-2 유전자 발현이 증가한다.<sup>34</sup> iNOS 유전자 발현도 리코펜, 나노캡슐화 리코펜 모두 20  $\mu$ g/mL 처리 농도에서 LPS 미처리 정상대조군 수준으로 억제되었고, 나노캡슐화 리코펜을 20  $\mu$ g/mL 농도로 처리하였을 때 정상대조군보다도 낮은 수준이었다. 본 연구에서 FL, NEL의 항염증 효과를 비교하였을 때 LPS로 유도한 염증반응에서 FL에 비해 NEL의 항염증 효과가 유의적으로 컸다.

생리활성 물질은 다양한 방법으로 염증반응을 차단한다. Conner와 Grisham은 생리활성물질이 지질과산화반응을 억제함으로써 간접적으로 염증반응을 억제하거나, 염증유발 관련 전사인자에 직접적으로 작용하여 염증반응을 억제한다고 보고하였다.<sup>35,36</sup> 염증반응의 연쇄반응에서 초기 염증유발성 사이토카인 생성을 감소시키는 것은 COX 2, iNOS의 반응으로 이어지는 연쇄반응을 차단하여 염증반응으로 인한 심혈관계 질환, 특정 암등의 발병위험도를 감소시킬 수 있다.<sup>35,37</sup>

세포를 이용한 많은 연구에서 리코펜이 항암, 항염증

효과와 관련된 기전들이 보고되었지만 리코펜은 낮은 생체 이용율이 제한점중의 하나였다.<sup>38,39</sup> 리코펜을 비롯한 polyphenol류를 유기물과 친수성 복합체를 형성하는 cyclodextrin을 이용하여 수용성으로 전환시키는 것은 생체이용성을 높을 수 있는 방법이다. Sahu 등은 수용성 polyethylene glycol (PEG)- $\beta$ -palmitate를 이용하여 커큐민을 캡슐화 시켜 DMSO에 용해시켰을 때 보다 항암 효과를 증진시켰다고 보고하였다.<sup>40</sup> Lee 등은 레스베라트롤의 입자크기가 100 nm보다 작았을 때 일반 레스베라트롤보다 용해가 잘되었으며 세포내로의 흡수 및 혈액 내로 전달이 증가되었다고 보고하였다.<sup>36</sup> Desai 등은 입자의 크기가 작을수록 세포내 또는 조직으로 내재화(interninternalization)가 잘 되며 나노입자를 캡슐화하여 경구투여하였을 때 미세유모에 쉽게 trap 되어 장내 머무르는 시간을 지연시킬 수 있다고 하였다.<sup>23</sup> 또한 동일한 연구에서 캡슐화에 쓰이는 고분자물은 느리게 분해되므로, 활성물질이 방출되는 시간을 연장시켜 생리활성이 작용되는 시간을 연장시켰음을 제시하였다. 세포내로 식물성 파이트케미컬의 유입증가가 나노입자화된 용액의 항염증 활성을 증가시키는 데 효과적이었을 가능성을 제시하고 있다. Jeong 등은 나노입자 추출시료의 경우 세포의 침투 용이성이 매우 유의적으로 증가하였다고 보고 하였다.<sup>41</sup>

## 요 약

본 연구는 maltodextrin cyclodextrin에 의해 형성된 고분자 미셀에 나노캡슐화 시킨 리코펜과 일반 리코펜을 LPS로 염증을 유도시킨 RAW 264.7 대식세포주에 다양한 농도 (0~20)로 처리하여 염증매개 사이토카인 유전자 발현과 단백질 생성, 염증매개 효소인 iNOS, COX-2 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 비교하였다. 나노캡슐화된 리코펜은 염증세포의 증식억제, 염증매개 사이토카인, 세포침식등의 염증으로 진행되는 데 관여하는 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 사이토카인과 iNOS, COX-2 유전자 발현을 일반리코펜에 비해 효과적으로 억제하고 사이토카인 단백질 생성억제를 통해 염증억제 효과를 증진시키는 것이 관찰되었다. 따라서 지용성으로 생체이용성이 낮은 생리활성물질의 건강증진효과를 개선시키기 위해 나노캡슐화는 좋은 모델이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## References

1. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 2000; 163(6): 739-744.
2. Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(5): 391-398.
3. Stahl W, Sies H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys* 1996; 336(1): 1-9.
4. Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(4): 317-331.
5. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(23): 1767-1776.
6. Schuurman AG, Goldbohm RA, Dorant E, van den Brandt PA. Vegetable and fruit consumption and prostate cancer risk: a cohort study in The Netherlands. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(8): 673-680.
7. Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Duncan C, Sharifi R, Ghosh L, van Breemen R, Ashton D, Bowen PE. Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(24): 1872-1879.
8. Kucuk O, Sarkar FH, Sakr W, Djuric Z, Pollak MN, Khachik F, Li YW, Banerjee M, Grignon D, Bertram JS, Crissman JD, Pontes EJ, Wood DP Jr. Phase II randomized clinical trial of lycopene supplementation before radical prostatectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(8): 861-868.
9. Michael McClain R, Bausch J. Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. *Regul Toxicol Pharmacol* 2003; 37(2): 274-285.
10. Borel P, Grolier P, Armand M, Partier A, Lafont H, Lairon D, Azais-Braesco V. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *J Lipid Res* 1996; 37(2): 250-261.
11. Castenmiller JJ, West CE. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu Rev Nutr* 1998; 18(1): 19-38.
12. Schierle J, Bretzel W, Bühler I, Faccin N, Hess D, Steiner K, Schüep W. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem* 1997; 59(3): 459-465.
13. Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2000; 40(1): 1-42.
14. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 1995; 9(15): 1551-1558.
15. Lee MT, Chen BH. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem* 2002; 78(4): 425-432.
16. Offord EA, Gautier JC, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Krämer K, Applegate LA. Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnolic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(12): 1293-1303.
17. Mokarram R, Mortazavi S, Najafi MH, Shahidi F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Res Int* 2009; 42(8): 1040-1045.
18. Yu H, Huang Q. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food Chem* 2010; 119(2): 669-674.
19. Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P. Synthesis of novel biode-



- gradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* 2008; 4(6): 1752-1761.
20. Ma Z, Haddadi A, Molavi O, Lavasanifar A, Lai R, Samuel J. Micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization, stabilization, and controlled delivery of curcumin. *J Biomed Mater Res A* 2008; 86(2): 300-310.
  21. Wang X, Jiang Y, Wang YW, Huang MT, Ho CT, Huang Q. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chem* 2008; 108(2): 419-424.
  22. Tomren MA, Másson M, Loftsson T, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin. *Int J Pharm* 2007; 338(1-2): 27-34.
  23. Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, Levy RJ. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res* 1996; 13(12): 1838-1845.
  24. Markovits N, Ben Amotz A, Levy Y. The effect of tomato-derived lycopene on low carotenoids and enhanced systemic inflammation and oxidation in severe obesity. *Isr Med Assoc J* 2009; 11(10): 598-601.
  25. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 2008; 659(1-2): 15-30.
  26. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2101-2114.e5.
  27. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 2011; 13(1): 11-22.
  28. Anisowicz A, Messineo M, Lee SW, Sager R. An NF-kappa B-like transcription factor mediates IL-1/TNF-alpha induction of gro in human fibroblasts. *J Immunol* 1991; 147(2): 520-527.
  29. Jones E, Adcock IM, Ahmed BY, Panchard NA. Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated Nitric Oxide production by PKCepsilon and JAK2 in RAW macrophages. *J Inflamm (Lond)* 2007; 4(1): 23.
  30. Ambs S, Hussain SP, Harris CC. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J* 1997; 11(6): 443-448.
  31. Bogdan C, Röhlhoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173(1): 17-26.
  32. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12(12): 1063-1073.
  33. Yang C, Liu X, Cao Q, Liang Q, Qiu X. Prostaglandin E receptors as inflammatory therapeutic targets for atherosclerosis. *Life Sci* 2011; 88(5-6): 201-205.
  34. Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59(5): 991-994.
  35. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12(4): 274-277.
  36. Lee CW, Yen FL, Huang HW, Wu TH, Ko HH, Tzeng WS, Lin CC. Resveratrol nanoparticle system improves dissolution properties and enhances the hepatoprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory pathways. *J Agric Food Chem* 2012; 60(18): 4662-4771.
  37. Crispin PL, Uzzo RG, Golovine K, Makhov P, Pollack A, Horwitz EM, Greenberg RE, Kolenko VM. Vitamin E succinate inhibits NF-kappaB and prevents the development of a metastatic phenotype in prostate cancer cells: implications for chemoprevention. *Prostate* 2007; 67(6): 582-590.
  38. Levy J, Bosin E, Feldman B, Giat Y, Miinster A, Danilenko M, Sharoni Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr Cancer* 1995; 24(3): 257-266.
  39. Pastori M, Pfander H, Boscoboinik D, Azzi A. Lycopene in association with alpha-tocopherol inhibits at physiological concentrations proliferation of prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250(3): 582-585.
  40. Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* 2008; 4(6): 1752-1761.
  41. Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY. Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsulated water extract from *rubus coreanus* miquel. *Korean J Med Crop Sci* 2009; 17(2): 83-89.