대한한의학 방제학회지 제19권 1호 THE KOREAN JOURNAL OF ORIENTAL MEDICAL PRESCRIPTION 19(1):195~205, 2011

그람-양성균(Peptidoglycan)으로 유도한 대식세포에서 감태 에탄올 추출물의 항염증 효과

강옥화[1,2], 김성배[1], 금준호[1], 문수현[1], 김용식[1], 안병관[1], 안현진[1], 권동렬[1]
[1]원광대학교 한약학과 원광한약연구소, [2]군산대학교 BK21 새만금해양환경연구팀

ABSTRACT

Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Ecklomia cava* on gram-positive bacteria(Peptidoglycan)-induced macrophages

Ok-Hwa Kang[1,2], Sung-Bae Kim[1], Joon-Ho Keum[1], Su-Hyun Mun[1], Yong-Sik Kim[1]
Byung-Kwan An[1], Hyeon-Jin An[1], Dong-Yeul Kwon[1]
[1]College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Won-Kwang University
[2]Dept. of Oceanography, Kunsan National University, Kunsan

Objectives : *Ecklonia cava* is brown alga(Laminariaceae) which grows is sea, it has antioxidant, diarrhea and anticoagulant effect. In this study, the effect of ethanol extract of *Ecklonia cava* (EC) on peptidoglycan(PGN) -induced NO production in RAW 264.7 cells was investigated.

Methods : In the present study, IL-6 production was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), prostaglandin E_2(PGE_2) production was measured using the EIA kit, and inducible NO synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), and mitogen-activated protein kinase(MAPK) activation, as determined by western blot analysis and reverse transcription

• 교신저자 : 권동렬
• 전북 익산시 신용동 344-2번지 원광대학교 한약학과 원광한약연구소
• Tel : 063-850-6802 Fax : 063-852-6802 E-mail : sssimi@wku.ac.kr
• 접수 : 2011/ 05/ 20 수정 : 2011/ 05/ 31 채택 : 2011/ 06/ 13

-polymerase chain reaction(RT-PCR).

Results : EC inhibited PGN-induced NO and IL-6 production. Consistent with these observations, the protein expression of iNOS and COX-2 were inhibited by EC. Moreover, EC suppressed the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase(ERK) 1/2 in PGN-induced RAW 264.7.

Conclusions : These results suggest that EC has inhibitory effects on PGN-induced PGE_2, NO, and IL-6 production, as well as the expressions of iNOS and COX-2 in the murine macrophage. These inhibitory effects occur through blockades on the MAPKs phosphorylation.

Key word : Ethanol extract of *Ecklonia cava*(EC), gram-positive bacteria(Peptidoglycan), anti-inflammation, Macrophages

Ⅰ. 서 론

감태(*Ecklonia cava*)는 갈조식물 다시마목(Laminariales) 미역과(Alariaceae)의 식물로서 식용 해조류로 이용되고 있으며, 최근 해양생물의 연구가 활발히 진행되어 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 주로 우리나라 제주연안과 남해안 동안에 서식하고 있는 감태는 항 HIV활성, 면역조절 작용, 항알러지 활성 등이 있다고 알려져 있다[1-3]. 또한, 최근 연구에서 감태에서 분리된 성분이 인간 대장에서의 항산화, 항염증 효능이 있는 것으로 밝혀졌다[4]. 본 연구는 감태의 에탄올 분획(EC)이 그람양성균 PGN에 의해 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 항염증 효능을 밝히고자 한다.

박테리아는 숙주의 선천면역계를 흥분시키며, 감염되면 사이토카인과 케모카인과 같은 염증성 분자들을 분비하게 한다[5,6]. Peptidoglycan(PGN)은 그람-양성균의 세포벽에 있는 당단백질로 N-acetylmuramyl과 N-acetylglucosaminyl glycan이 반복된 다당 사슬이 올리고펩티드에 의해 연결된 화합물이다[7,8]. Lipopolysacharide(LPS)와 마찬가지로 PGN은 세균의 감염에 의해 염증이나 발열, 패혈증에 의한 쇼크를 유발한다[9]. 이러한 작용의 대부분은 대식세포의 활성화와 전염증성 사이토카인의 생성에 기인한다[10].

대식세포(macrophages)는 자연면역뿐만 아니라 획득 면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 숙주방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응 시에는 reactive oxygen species(ROS)와 IL-6, TNF-α와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다[11]. 대식세포가 탐색한 이물질을 분해시킬 때 생성되는 TNF-α나 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다[12,13]. 따라서 NO 생성 저해제는 패혈증쇼크, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 이러한 조절제를 천연물에서 찾기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 해양생물인 감태 에탄올추출물의 항염증 효과를 알아보기 위

해 그람-양성균(PGN)으로 유도된 대식세포에서 NO, PGE_2 생성량과 iNOS, COX-2의 발현 및 IL-6에 미치는 영향을 알아보고 그 기전을 밝히고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 시 약

PGN(derived from *Staphylococcus aureus*), 소혈청알부민 (BSA), FBS, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole (MTT), PD098059는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, RPMI 1640, 페니실린/스트렙토마이신은 Hyclone(Hyclone Labs Logan, UT)에서 구입하였다. p38, p-p38, ERK, p-ERK, JNK, p-JNK monoclonal 항체와 peroxide conjugated 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. 그리고 RNA extraction kit는 iNtRON(iNtRON, Korea)에서 구입하였다. COX-2, iNOS, β-actin oligonucleotide는 Bioneer(Bioneer Corporation, Korea)에서 구입하였다.

2) 약 재

감태는 전라남도 완도에서 채취하였다. 증거표본(No. 07-32)은 전북 익산시 원광대학교 약학대학 본초학연구실에 보존하였다.

3) Primer 준비

RT-PCR을 위해 여러 개의 primer를 사용하였다. Primer의 구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. primer sequences for RT-PCR

cDNA		Primer sequence
IL-6	forward	5'-CATGTTCTCTGGGAAATCGTGG-3'
	reverse	5'-AACGCACTAGGTTTGCCGAGTA-3'
iNOS	forward	5'-AGCCCAACAATACAAATGACCCTA-3'
	reverse	5'-TTCCTGTTGTTTCTATTTCCTTTGT-3'
COX-2	forward	5'-CACTCAGTTTGTTGAGTCATTC-3'
	reverse	5'-GATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3'
β-actin	forward	5-ATGAAGATCCTGACCGAGCGT-3'
	reverse	5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

2. 방 법

1) 시료의 조제방법

감태는 100% 에탄올로 2시간씩 3회 환류추출을 하였다. 추출된 추출물은 1 L 회전 감압 농축기(N-1000S, EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였고, 4℃에서 보관 되었다. 농축 건조된 추출물을 인산완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 용해하였다.

2) 세포 배양

대식세포(murine macrophage cell line, RAW264.7)는 한국 세포주 은행으로부터 구입하여 사용하였다(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology American Tissue Culture Collection). 대식세포는 항생제 및 항균제로서 100 U/mL의 페니실린 G과 100 U/mL의 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가하고 10% 열처리 우태아 혈청(heat inactivated FBS)을 첨가한 완전한 RPMI 1640 배지에서 5% CO_2의 습한 대기, 37℃의 온도조건으로 배양하였다.

3) MTT 분석

EC의 세포에 대한 독성 측정은 3-(4,5-Dimethylthiazol

-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole(MTT) assay 방법으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTT가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 $5x10^4$ cells/mL의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약재를 농도별(50, 100 μg/mL)로 처리하였다. MTT 용액(5 mg/mL)를 각 well에 넣고 4시간동안 다시 배양하였다. 이후 상층액을 제거하고 100 μL의 디메틸설폭사이드(DMSO)를 각 well에 넣었다. 그렇게 처리한 후 흡광도를 590 nm에서 측정하였다. 세포 독성은 아무 처리를 하지 않은 그룹과 각 그룹의 흡광도의 비율로 계산하였다.

4) NO 생성량 측정

EC를 $5x10^5$ cells/mL의 RAW 264.7세포가 배양된 96 well plate에 농도별(50, 100 μg/mL)로 전처리하고, 여기에 PGN을 각각 주입하였다. 배양한 대식세포주의 상층액을 수집하여 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid solution)와 동량으로 주입한 후 570㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) ELISA

RAW 264.7 세포를 $5x10^5$ cells/mL로 24 well plate에 접종하고, 5% CO_2 항온기에서 배양 하였다. 이후 배지를 교체하고 EC(50, 100 μg/mL)을 각각 처리한 후, PGN 자극한 후 세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 IL-6 생성량을 ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량해 분석하였다.

6) PGE_2 측정

RAW 264.7 세포를 $5x10^5$ cells/mL로 24 well plate 에 접종하고, 5% CO_2 항온기에서 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 EC(50, 100 μg/mL)을 각각 처리한 후, PGN으로 자극한 후 세포부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 PGE_2 생성양을 EIA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량해 분석하였다.

7) RNA 분리 및 RT-PCR

EC에 의한 염증인자의 억제와 iNOS 및 COX-2, IL-6 mRNA 발현과의 상관성을 알아보기 위하여 RT-PCR로 mRNA 발현을 조사하였다. RNA 및 RT-PCR RNA는 RAW 264.7세포 5×10^6 cells/mL로 분주한 다음, 여기서 얻어진 RNA 에 MuLV 역전사효소(reverse transcriptase), 1mM dNTP를 넣어 cDNA를 만들었다. 여기에 IL-6, iNOS, COX-2, β-actin 프라이머를 넣고 유전자 증폭기(thermal cycler)를 이용하여 증폭시켰다. 만들어진 RNA를 2% 아가로스 겔에 전기 영동시켜 UV 검출기로 확인하였다.

8) Western blot analysis

2×10^6 cells/mL로 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS(phosphate buffered saline)로 세척 한 후 lysis buffer을 첨가하여 lysis 시킨 후 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. lysate를 mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(0.1% Tween20 + TBS) 용액에 상온에서 실시하였다. ERK의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse ERK(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 반응시킨 후 TTBS로 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 희석하여 상온에서 반응시킨 후, TTBS로 세정하여 ECL 기질(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

9) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차(SE)를 구하여 그 유의성은 Student's t-test 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포생존율

감태에탄올 추출물 (EC)이 세포독성에 영향을 주는지 알아보기 위해 MTT 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. EC를 50 μg/mL, 100 μg/mL의 농도로 처리 하였을 때 모두에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

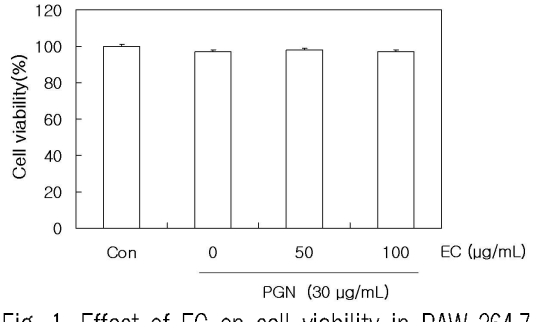

Fig. 1. Effect of EC on cell viability in RAW 264.7 cells.

Cell viability was evaluated with the MTT assay. Data represent the means±S.E. of duplicate determinations from three separate experiments.

2. PGN으로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO에 대한 감태에탄올 추출물(EC)의 억제 효과

NO의 발현은 염증을 포함한 다양한 상태로 여겨진다. RAW 264.7에서 PGN으로 유도된 NO의 발현에 대한 EC의 효과를 측정하기 위해, 세포에 EC를 전 처리하거나 처리하지 않고 1시간 후에 PGN(30 μg/mL)로 자극했다. PD098059는 ERK 1/2의 억제제로 대조군으로 사용하였다. 세포자극 24시간 후 세포배양액을 채취하여 NO의 양을 Griess 시약 반응을 통해 결정하였다. PGN으로 자극한 세포는 자극하지 않은 세포에 비해 5배 이상의 NO를 발현하였으나, EC(100 μg/mL)의 농도에서는 ERK 1/2이 억제제 PD098059(30 μM)보다 통계적으로 유의하게 억제하였다(Fig. 2).

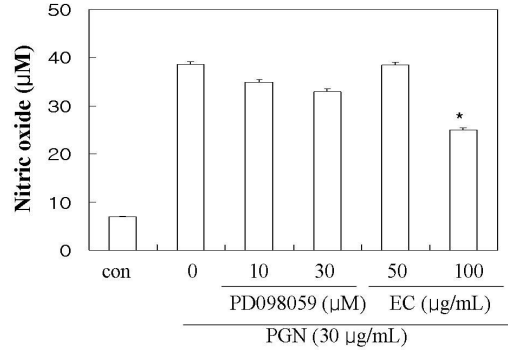

Fig. 2. Effects of EC on PGN-induced NO production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of EC and PD098059(ERK inhibitor) for 1 hour prior to being incubated with PGN(30 μg/mL) for 24 hours. The culture supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite levels. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. *$P < 0.05$ vs. the PGN treated group; significances between treated groups were determined using the Student's *t*-test.

3. PGN으로 유도된 RAW 264.7 세포에서 IL-6 생성과 발현에 대한 감태에탄올 추출물(EC)의 억제 효과

PGN로 유도된 IL-6 생성에 대한 EC의 효과를 ELISA를 이용해서 관찰하였고, IL-6 mRNA 발현에 대한 EC의 효과를 RT-PCR 분석법으로 실험하였다. 그 결과, 50과 100 μg/mL 농도의 EC를 전 처리한 경우에 IL-6의 생성과 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 3).

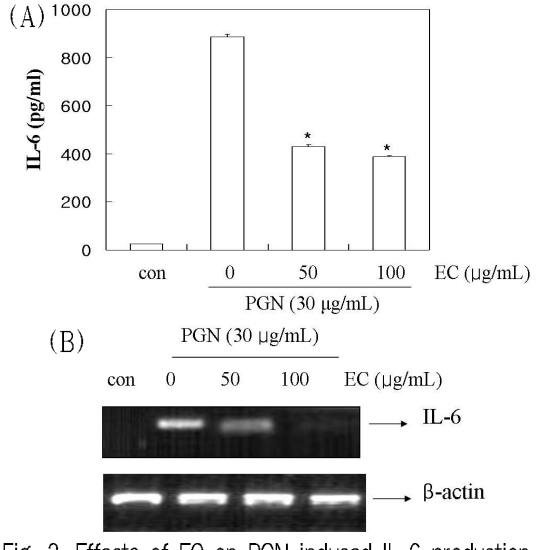

Fig. 3. Effects of EC on PGN-induced IL-6 production and IL-6 mRNA expression in RAW 264.7 cells.

(A) RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of EC for 1 hour before being incubated with PGN(30 μg/mL) for 24 hours. Production of IL-6 was measured by ELISA. Cells were pretreated with the indicated concentrations of EC for 1 hour before being incubated with PGN(30 μg/mL) for 24 hours. The experiment was repeated three times and similar results were obtained. Results are mean ± S.E. Statistical significance: $*p < 0.05$ vs. the LPS or PGN treated group; significances between treated groups were determined using the Student's *t*-test.
(B) IL-6 mRNA was assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of EC for 1 hour before being incubated with PGN(30 μg/mL) for 24 hours. The β-actin mRNA was carried out in parallel to confirm equivalency of cDNA preparation. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

4. PGN으로 유도된 RAW 264.7 세포에서 PGE_2 생성에 대한 감태에탄올 추출물(EC)의 억제 효과

EC가 PGE_2생성을 억제하는지 약리학적인 효능 평가를 실시하기위해 EC를 각각 50 μg/mL, 100 μg/mL 농도로 1시간 동안 전 처리한 후, PGN으로 세포를 자극한 후 세포 부유액을 원심분리하여 세포들을 침전시켜 상층액을 수집하고, 상층액 내 PGE_2 생성양을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4에서와 같이 PGN에 의해 PGE_2 생성양 증가하였고, EC를 각각 50 μg/mL, 100 μg/mL 모두에서 억제되었다.

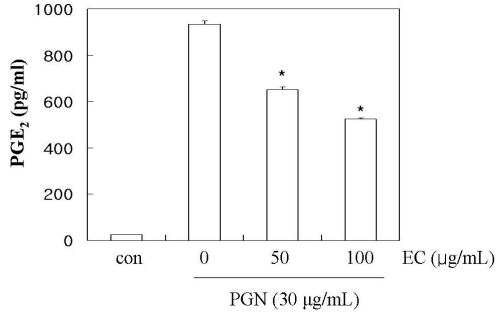

Fig. 4. Effects of EC on PGN-induced PGE_2 production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of EC for 1 hour before being incubated with PGN (30 μg/mL) for 24 hours. Control cells were incubated with the vehicle alone. $*P < 0.05$ vs. the PGN treated group; significances between treated groups were determined using the Student's *t*-test.

5. PGN으로 유도된 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 mRNA 발현에 대한 감태에탄올 추출물(EC)의 억제 효과

EC의 NO와 PGE_2 억제효과가 iNOS와 COX-2 mRNA 발현에 어떤 관계가 있는지 확인하기 위해 RT-PCR을 수행했다. RAW 264.7 세포에서는 PGN을 처리하였을 때 iNOS와 COX-2 mRNA 발현이 급격히 증가하였으며, EC를 전 처리하면 iNOS와 COX-2의 발현이 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 5).

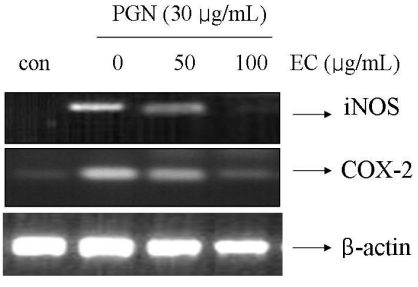

Fig. 5. Effects of EC on PGN-induced iNOS and COX-2 mRNA expression in RAW 264.7 cells.

iNOS and COX-2 mRNA was assessed by RT-PCR in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of EC for 1 hour before being incubated with PGN(30 μg/mL)for 24 hours. The β-actin mRNA was carried out in parallel to confirm equivalency of cDNA preparation. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

6. PGN으로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs의 인산화에 대한 감태에탄올 추출물(EC)의 억제 효과

PGN으로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs의 인산화에 대한 감태에탄올 추출물(EC)의 효과를 Western blot analysis를 통해 확인하였다. EC (50 μg/mL, 100 μg/mL)는 PGN으로 자극된 RAW 264.7 세포에서 ERK 1/2 MAPK의 인산화를 농도의존적으로 억제하였다. 그러나 p38과 JNK MAPK의 인산화에는 영향을 주지 않았다(Fig. 6).

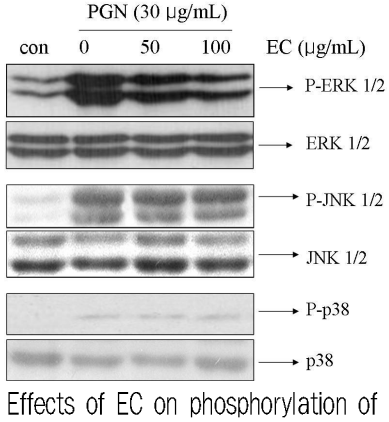

Fig. 6. Effects of EC on phosphorylation of MAPKs in PGN-induced RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of EC for 1 h before being incubated with PGN(30 μg/mL) for 30 min. Whole cell lysates were analyzed by Western blot analysis. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

Ⅳ. 고 찰

최근 의약품의 연구동향은 여러 가지 부작용이나 독성 및 내성 등이 심각해지고 있으므로 세계적으로 천연물로부터의 의약품 개발에 관한 연구가 활발히 추진되고 있다. 한편, 우리나라를 위시한 동양에서는 장구한 시일을 통하여 천연약물의 하나인 전통약물의 꾸준한 발전을 도모해 온 배경을 갖고 있다. 그중에서 해양 생물자원은 식량 뿐만 아니라 질병치료의 목적으로도 이용해왔다. 지구상에 존재하는 생물의 80%가 바다에서 살고 있으며 이중 실제 우리 인간이 사용하고 있는 자원은 1% 미만이고 우리나라의 경우 3면이 바다로 둘러싸여 있다는 점을 고려할 때, 차세대 원천 자원인 해양생물 확보에 천혜의 조건을 갖추고 있다고 볼 수 있다.

본 연구에서 사용한 감태는 다시마목(Laminariales) 미역과(Alariaceae)에 속하는 갈조류로 우리나라 제주도와 남해안 일대의 조하대에 널리 분포하는 해조류이다. 최근 감태의 다양한 생리활성이 밝혀지면서 감태가 식의약품의 원료로써 주목받고 있다. 특히, 감태는 다른 대형 갈조류에 비해 다량의 polyphenolic compound를 함유하는 것으로 알려져 있으며[14]. 감태의 유기용매 추출물이나 이로부터 분리한 phlorotannins류 들이 항염증, 항산화, 항바이러스, 항비만, 및 tyrosinase 저해 활성 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 밝혀졌다[1-4,15,16]. 뿐만 아니라 감태 에탄올 추출물과 phlorotannins의 알레르기 억제 효과에 관한 연구가 다양하게 이루어졌다[17-19]. 또한 감태에는 알긴산, 푸코이단, 라미나란과 같은 수용성 식이섬유들이 다량 함유

되어 있다[20]. 이에 본 연구에서는 감태 에탄올추출물을 이용하여 대식세포에서 항염증 효과를 관찰하였다.

In vitro 염증모델에서 그람-음성균인 LPS는 세포수준의 모델의 보편적인 염증 자극인자로 알려져 있다. 그러나 그람-양성균인 PGN에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 PGN로 유도된 대식세포에서 감태의 에탄올 추출물(EC) 항염증 효능을 실험하였다.

NO는 자율신경계와 중추신경계의 대식세포를 포함하는 몇몇 기관에 있어 세포 간 신호 전달에 중요한 인자 중 하나로 알려져 있다[21]. 그러나 NO의 과도한 생성은 건강에 해로울 수 있으며, 패혈성 쇼크, 류마티스성 관절염, 자가 면역 질환을 일으킬 수 있다[22]. NO생산의 억제는 NO의 과다생성으로 인한 질병의 치료에 이로운 효과가 있을 수 있다[23,24]. 또한 iNOS 억제제 개발의 측면에서 iNOS 효소 발현의 억제제를 개발 및 합성하는 것은 약물 개발 전략에 유효한 것으로 드러나고 있다. 그리고 COX-2는 염증성 질환을 가진 동물이나 환자의 염증성 부위에서 강하게 유발되는 것으로 알려져 왔다[25]. 이번 연구에서 보면, PGN에 노출된 대식세포가 NO생성량이 늘어나는 것으로 볼 때 배지에 IL-6, NO를 축적하는 것과 관련이 있다. 또한 PGN으로 유도된 IL-6와 NO, PGE_2 생성은 EC의 처리에 의해 억제되었다. 또한, 따라서 대식세포에서 염증성 인자나 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것은 염증을 치료하는 새로운 전략이 될 수 있음을 암시한다.

또한, 현재까지 비교적 잘 알려진 염증반응의 분자신호 전달기전은 MAPK superfamily에 속하는 세 가지 효소들로 extracellularregulated protein kinase(ERK), c-Jun NH2-protein kinase(JNK)/stress-activated protein kinase(SAPK), serine/threonine protein kinase인 p38 MAPK 등을 들 수 있다. 이들 MAPKs는 모두 다양한 세포외 자극에 반응해 upstream MAPK kinase(MEK)에 의해 tyrosine과 threonine에서 인산화가 일어남으로써 활성화된다. 위의 MAPKs의 활성형은 그 후에 다른 kinase나 전사 인자를 인산화, 활성화 시키고, 결국 표적 유전자의 발현을 변화시킨다. 어떤 보고에 의하면 RAW 264.7세포에서 LPS로 유도된 COX-2 발현이 MAPK 저해제들인 PD98059와 SB203580에 의해 ERK1/2와 p38 MAPK 활성화가 각각 차단됨으로써 부분적으로 억제된다는 것을 증명했다[26]. 유사하게 마우스 대식세포 J774에서 phospholipase A2 저해제인 methyl arachidonyl fluorophosphonate에 의한 COX-2 유도는 PD98059와 SB203580을 포함한 MAPK 저해제에 의해 억제되었다[27]. 마찬가지로 LPS는 단핵세포에서 ERK2와 p38 MAPK의 인산화와 활성화처럼 COX-2 단백질과 그것의 mRNA 전사물이 발현을 유도하였다는 보고가 있다[28].

따라서 본 연구에서도 EC가 NO와 COX-2, IL-6와 같은 염증매개체들을 어떠한 신호전달을 통해 억제하는지 알아보기 위해 MAPKs의 인산화를 억제하는지 알아보았다. 그 결과 MAPKs의 인산화는 PGN으로 유도한 대식세포의 염증반응은 ERK 1/2의 인산화를 억제하는 것을 보여준다.

이러한 결과는 EC가 PGN으로 유도된 대식세포를 매개로한 염증반응의 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 수 있고, 그람-양성균에 의한 염증질환의 새로운 치료 후보물질임을 알 수 있다.

V. 결 론

설치류의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 PGN으로 자극 하였을 때 감태 에탄올 추출물(EC)의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EC는 PGN으로 유도된 대식세포에서 NO와 PGE_2생성을 농도 의존적으로 억제하였다.
2. EC는 PGN으로 유도된 전염증성 사이토카인

IL-6생성과 발현을 현저하게 억제하였다.

3. EC는 PGN으로 유도된 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 억제하였다.
4. EC 전 처리시 PGN으로 유도된 MAPKs 인산화를 저해 하는지 알아보기 위해 western blot을 수행한 결과 MAPKs(ERK1/2) 인산화를 저해하였다.

이와 같은 결과로 보아 감태 에탄올 추출물은 대식세포에 작용하여 MAPKs의 인산화 저해를 통해 NO, PGE_2, IL-6의 생성과 iNOS, COX-2 발현을 억제함으로써 항염증에 효과가 있음을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행 되었기에 이에 감사드립니다. (KRF-2008-532-E00033)

참고문헌

1. Artan M, Li Y, Karadeniz F, Lee SH, Kim MM, Kim SK. Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6,6'-bieckol, from Ecklonia cava. Bio org Med Chem. 2006;16(17):7921-6.
2. Ahn G, Hwang I, Park E, Kim J, Jeon YJ, Lee J, Park JW, Jee Y. Physiological Activities of Hot Water Extracts from Ecklonia cava Kjellman Mar Biotechnol(NY). 2006;10(3):278-89.
3. Cho EK, Choi YJ. Physiological Activities of Hot Water Extracts from Ecklonia cava Kjellman. Journal of Life Science. 2010;20(11):1675-82.
4. Kang K, Hwang HJ, Hong DH, Park Y, Kim SH, Lee BH, Shin HC. Antioxidant and antiinclammatory activities of vantol, a phlorotannin -rich natural agent derived from Ecklonia cava, and its effect on proteoglycan degradation in cartilage explant culture. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 2004;115-116:77-95.
5. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr. An ancient system of host defense. Curr. Opin. Immunol. 1998;10:12-5.
6. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 1999;284:1313-8.
7. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu. Rev. Immunol. 1995;13:437-57.
8. Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Matsuo T. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. Eur J Oral Sci. 2010;118(2):145-50.
9. Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 1972;36:407-77.
10. Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta D. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2--> MyD88--> IRAK--> TRAF--> NIK--> IKK--> NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. Infect. Immun. 2001;69:2270-6.
11. Taylor PR, Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Gordon S. The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor(dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. J Immunol. 2004 Jan 15 ;172(2):1157-62.
12. 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 Jan;211(1):24-32. Review.

13. Corbett JA, McDaniel ML. Intraislet release of interleukin 1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. J Exp Med. 1995 Feb 1;181(2):559-68.
14. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. Bioresour Technol. 2005;96:1613-23.
15. Ahn MJ, Yoon KD, Min SY, Lee JS, Kim JH, Kim TG,Kim SH, Kim NG, Hun H, Kim J. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga Ecklonia cava. Biol Pharm Bull 2004;27 :544-7.
16. Kim JA, Lee JM, Shin DB, Lee NH. The antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of phlorotannins in Ecklonia cava. Food Sci Biotechnol. 2004;13:476-80.
17. Kim SK, Lee DY, Jung WK, Kim JH, Choi I, Park SG, Seo SK, Lee SW, Lee CM, Yea SS, Choi YH, Choi IW. Effects of Ecklonia cava ethanolic extracts on airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine asthma model: role of suppressor of cytokine signaling. Biomed Pharmacother. 2008;62:289-96.
18. Le QT, Li Y, Qian ZJ, Kim MM, Kim SK. Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine alga Ecklonia cava on histamine release. Process Biochem. 2009;44:168-76.
19. Shim SY, To LQ, Lee SH, Kim SK. Ecklonia cava extract suppresses the high-affinity IgE receptor, FcεR I expression. Food Chem Toxicol. 2009;47:555-60.
20. Ahn GN, Hwang IS, Park EJ, Kim JH, Jeon YJ, Lee JH, Park JW, Jee YH. Immunomodulatory effects of enzymatic extract from Ecklonia cava on murine splenocytes. Mar Biotechnol. 2008; 10:278-89.
21. Koyanagi M, Egashira K, Kubo-Inoue M, Usui M, Kitamoto S, Tomita H, Shimokawa H, Takeshita A. Role of transforming growth factor-beta1 in cardiovascular inflammatory changes induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. Hypertension. 2000;35(1 Pt 1) :86-90.
22. Evans CH. Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? Agents Actions Suppl. 1995;47:107-16.
23. Kim KW, Ha KT, Park CS, Jin UH, Chang HW, Lee IS, Kim CH. Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. Vascul Pharmacol. 2007;47(2-3):99-107.
24. Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1995;352(4):351-64.
25. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclo-oxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(8):3228-32.
26. Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL, Jung SH, Kang SM, Kim YS, Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by Platycodon grandiflorum saponins via suppression of nuclear factor-kappaB activation in RAW 264.7 cells. Life Sci. 2005;76:2315-232.
27. Chen C, Chen YH, Lin WW. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophage. Immunology

1999;97:124-9.
28. Chen Y, Yang L, Lee TJ. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. Biochem Pharmacol 2000;59:1445-57.