

## Anti-Inflammatory and Antioxidant Effect of Astaxanthin Derived from Microalgae

Tae Won Kwak<sup>1</sup>, Ji Young Cha<sup>1</sup>, Chul Won Lee<sup>2</sup> and Young Min Kim<sup>3</sup>, Byung Hong Yoo<sup>3</sup>, Sung Gu Kim<sup>3</sup>, Jong-Myoung Kim<sup>4</sup>, Seongha Park<sup>1</sup> and Won Gun An<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

<sup>2</sup>Institute of Marine BioTechnology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

<sup>3</sup>Bio Port Korea, Inc., Busan 619-912, Korea

<sup>4</sup>College of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Received May 31, 2011 / Revised June 28, 2011 / Accepted July 8, 2011

Astaxanthin (ATX) is a red-orange carotenoid pigment that occurs naturally in a wide variety of living organisms. In this study we investigated the inhibitory effects of ATX on the induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitric oxide (NO), proinflammatory cytokines, nuclear factor-kappa B (NF-κB) and reactive oxygen species (ROS) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells. In addition, we tested the superoxide radical scavenging activity of ATX by scavenging assay. iNOS and NF-κB expressions were determined by immunoblot analysis. Interleukin (IL)-6 and tumour necrosis factor-α (TNF-α) were assayed by ELISA. NO production was monitored by measuring the amount of nitrite. ROS was examined by using the 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) method. At a concentration of 100 μM, ATX inhibited the expression level of LPS-induced NF-κB, as well as the production of LPS-induced NO and proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF-α), by suppressing iNOS expression. In particular, the maximal inhibition rate of IL-6 and TNF-α production by ATX (100 μM) was 65.2% and 21.2%, respectively. In addition, ATX inhibited the LPS-induced transcriptional activity of NF-κB, and this was associated with suppressing the translocations of NF-κB from the cytosol to the nucleus. Moreover, at various concentrations (25-100 μM), ATX inhibited the intracellular level of ROS. At a concentration of 5 mg/ml, the superoxide radical scavenging activity of ATX was 1.33 times higher than α-tocopherol of the same concentration. These results showed that ATX inhibited the expression of iNOS and the production of NO and proinflammatory cytokines resulting from ROS production and NF-κB activation in macrophages. Furthermore, ATX was found to be more effective in superoxide radical scavenging activities compared to α-tocopherol. These findings are expected to strengthen the position of ATX as anti-inflammatory medicine and antioxidant.

**Key words** : Astaxanthin, anti-inflammatory effect, nuclear factor-kappa B, interleukin-6, superoxide radical scavenging activity

## 서 론

염증은 물리·화학적 독성 자극이나 미생물의 독성물질에 의해 신체조직에서 발생하는 상해를 제거하여 본 상태로 회복시키려는 유기체의 반응이다. 염증반응에서 자극은 직접 생체에 작용하여 손상을 주기도 하지만, 대개 간접적으로 내인성 화학전달물질을 통해 국소의 혈관이나 세포에 전달되며, 이로 말미암아 관절염, 천식, 자가면역질환 그리고 동맥경화증과 같은 다양한 질병이 발생한다[12,29]. 이러한 질병의 원인이 Reactive Oxygen Species (ROS) 생성에 관련이 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 염증과 ROS와의 연계성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[22]. Miesel 등[25]은 매우 독성이 강한 산화제인 superoxide를 포함하는 ROS는 염증기간 동안에 조직 손

상을 직접 초래할 수 있다고 보고하였다. 이러한 조직손상이 암의 발생 및 악성종양화와 관련이 있다.

최근 연구결과에 따르면 세포내 면역반응의 전사인자인 nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 염증질환, 암의 발생 및 전이, 악성종양화, 자가면역질환 등에 중심적인 역할을 하는 것이 밝혀져 염증 및 암 치료의 중심 target molecule로 대두되고 있다. NF-κB는 세포에 가해지는 스트레스에 대한 면역응답을 매개하는 전사인자임과 동시에 면역체계의 형성과정과 장기 발육에도 깊이 관여하고 있으며 ROS 및 독소물질 등에 의해 과다 활성화되면 면역과민반응과 함께 류마티스관절염, 각종 알레르기성 염증, 자가면역질환 등의 염증성질환과 다양한 암을 유발시키는 것으로 알려져 있다[9,16,21].

미세조류 중 *Haematococcus pluvialis*가 생산하는 생리활성물질인 astaxanthin (ATX, 3,3'-dihydroxy-β, β'-carotene-4,4'-dione)은 자연계에 널리 분포되어 있는 ketocarotenoid로 polysoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8455, Fax : +82-51-510-8437

E-mail : wgan@pusan.ac.kr

ring의 결합체이며[31], 물고기와 동물의 음식물 속에 들어있는 색소의 원료일 뿐만 아니라, vitamin E와  $\beta$ -carotene 보다 강한 free radical 항산화활성을 가진 잠재력이 있는 물질이다 [10,18]. 또한, 이 생리활성물질은 과산화상태에서 막의 phospholipid와 다른 지질들을 보호하는 기능을 가진 우수한 물질로 알려져 있으며[26,27], 특히 이 물질의 항산화작용은 singlet oxygen 및 free radical을 소거함으로 항암 및 면역기능활성에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[3,4,17, 19,34]. ATX에 대한 연구보고는 많으나, 항염 및 항산화작용에 대한 명료한 기작 및 효과를 증명하는 결과는 아직도 미미한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 미세조류로부터 유래한 ATX를 이용하여 항염 및 항산화작용에 대한 기작 및 효과를 검증하고, 류마티스관절염, 알러지, 천식, 암 등의 주요조절인자인 NF- $\kappa$ B의 활성억제를 검증하여 항염증제, 항산화제 및 항암치료제로서의 가능성을 타진하고자 한다.

## 재료 및 방법

### ATX의 제조

ATX의 생산을 위해 기본적으로 NB/2 배지(효율적인 성장을 위해 다른 질소원을 추가적으로 첨가)에서 *Haematococcus pluvialis* CCAP-34/1F 균주를 배양하였으며, 다른 배양조건으로는 25°C, 160 rpm, 10% inoculum, 초기 pH는 7.0, 조도는 3,000-3,500 lux를 선정하였다. ATX의 생산유도를 위해 vegetative cell로부터 cyst cell을 만드는 배양조건을 23°C, 150 rpm, 14,000 lux로 하여 15일째 붉은 색의 배양액을 확인하였다. 균체를 원심분리하여 균을 모으고 25 ml의 아세톤을 첨가하여 과쇄한 후 냉각추출을 반복하였다. 그 후, 감압농축을 하였고 n-Hexane으로 다시 추출한 후, 물로 3번 세척하였고, sodium sulfate anhydrous를 이용하여 잔류수분을 제거한 후 ATX 추출물을 제조하였다. 본 실험에서는 ATX를 0.01% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 사용하였다.

### 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Hyclone (Thermo Scientific Inc., Bremen, Germany)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터, penicillin 및 streptomycin은 Gibco/BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다. Anti-iNOS monoclonal antibody는 Calbiochem (San Diego, Calif.)에서, Anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody는 Sigma Aldrich Co.로부터 구입하였다. Anti-NF- $\kappa$ B p65 monoclonal antibodies와 peroxidase-conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였고, interleukin (IL)-6 및 tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ELISA Kits는 Pierce Endogen (Rockford, IL, USA)에서

Promega luciferase assay system은 Promega (Madison, CA, USA)로부터 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), sulfanilamide, lipopolysaccharide (LPS) 및 다른 모든 시약들은 Sigma Aldrich Co.에서 구입하였다.

### 세포배양

대식세포주인 RAW264.7 cell은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, NF- $\kappa$ B 전사활성을 측정하기 위하여 NF- $\kappa$ B reporter construct로 transfection된 RAW264.7 cell (이하 NGL cell)은 주명수 교수로부터 분양 받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 세포를 배양하여 실험에 이용하였다.

### 세포 생존율 측정

RAW264.7 cell을 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 16시간 배양한 후, ATX를 농도별(25-100  $\mu$ M)로 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 그 후, lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 20시간 배양하였다. 세포배양액을 제거한 후, 세포에 MTT를 0.5 mg/ml의 농도로 처리하여 4시간 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 ELISA microplate reader (Tecan, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포의 생존율은 control cell에 대한 백분율로 표시하였다.

### Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW264.7 cell을 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 16시간 배양한 후, ATX를 농도별(25-100  $\mu$ M)로 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 그 후, LPS로 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 20시간 배양하고, NO의 양을 Griess 시약으로 측정하였다. 즉, 세포배양액 100  $\mu$ l와 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96 well plate에서 15분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 ELISA microplate reader (Tecan, USA)로 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)로 흡광도를 측정하여 표준곡선을 얻은 후, NO의 농도를 산출하였다.

### Immunoblot analysis

1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM b-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)와 1 mg/ml leupeptin을 포함하는 buffer를 이용하여 cell을 lysis

하였고, cell lysates를  $10,000\times g$ 로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현은 anti-iNOS antibody를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, anti-NF- $\kappa$ B p65 monoclonal antibody를 사용하여 NF- $\kappa$ B를 측정하였다. 2차 antibody로는 goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP)를 사용하였으며, iNOS와 NF- $\kappa$ B의 band는 ECL immuno blotting detection reagents (Amersham)를 이용하여 발색하였다.

#### 핵 분획제조

세포를 냉각시킨 PBS로 2회 세척하고, 이것을 PBS와 함께 microtube에 넣어  $2,000\times g$ 로 5분간 원심분리한 후, PBS를 제거하고, 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride를 함유하는 hypotonic buffer를 넣어 10분간 얼음위에 놓은 후,  $7,200\times g$ 로 5분간 원심분리하였다. 그 후, 상등액을 제거하고 crude nuclei가 함유된 pellet에 20 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF를 함유하는 추출용 buffer 50  $\mu$ l를 넣어 30분간 얼음 위에 방치한 후, 10분간  $15,800\times g$ 로 원심분리하여 핵분획이 포함된 상등액을 얻어 실험에 이용하였다.

#### Cytokine 측정

96 well plate에 세포( $5\times 10^5$  cells/ml)를 분주하여 16시간 동안 배양한 후, ATX를 농도별(25-100  $\mu$ M)로 1시간 처리한 후, LPS로 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  incubator에서 20시간 배양하였다. 세포배양액 안에 존재하는 IL-6와 TNF- $\alpha$  생성량을 ELISA Kit (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

Reporter constructs, transfection, reporter cell line, and luciferase assay

NGL cell ( $5\times 10^5$  cells/ml)를 16시간 배양한 후, ATX를 농도별(25-100  $\mu$ M)로 1시간 처리한 후 LPS (1  $\mu$ g/ml)로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, cell을 분리하여 Promega luciferase assay system (Promega, Madison, CA, USA)과 luminometer (Tecan, USA)를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다. NF- $\kappa$ B 매개된 luciferase activity를 총 cell lysates의 단백질함량으로 표준화하였고, 단백질의 양은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정하였다.

#### Superoxide radical scavenging activity assay

Superoxide radical (O $_2^-$ ) scavenging activity assay는 산소 라디칼의 제거능을 확인하는 실험법으로 PMS-NADH superoxide generating system을 이용하였다. 즉, Nitroblue tetrazolium (NBT, 156  $\mu$ M) 1 ml와  $\beta$ -nicotinamide adenine dinu-

cleotide hydrate (NADH, 468  $\mu$ M) 1 ml를 혼합하고, positive control과 각 농도의 시료를 1 ml씩 넣어 교반한 후, 1 ml의 phenazine methosulfate (PMS, 60  $\mu$ M)를 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양한 후, 560 nm에서 absorbance를 측정하였다.

#### ROS 생성측정

RAW264.7 cell 내에 생성되는 산소라디칼 ROS를 측정하기 위하여 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하였다. 세포에 ATX를 농도별로 1시간 처리한 후, LPS (10  $\mu$ g/ml)를 이용하여 24시간 동안 oxidative stress를 유발시켰다. 원심분리를 이용하여 pellet을 수집한 후, cell lysis buffer를 이용하여 시료를 추출해 실험에 이용하였다. 190  $\mu$ l의 PBS와 50  $\mu$ l의 125  $\mu$ M DCFH-DA와 10  $\mu$ l의 시료를 96 well plate (black)에 넣고 잘 혼합하여 30분 동안 배양하였으며 그 후, fluorescence spectrophotometer (Tecan, USA)를 이용하여 Ex: 485 nm와 Em: 530 nm에서 측정한 후, ROS 생성수준을 fluorescence/mg protein으로 계산하였다. 시료의 protein 함량은 BCA protein assay를 이용하여 측정하였다.

#### 통계학적 분석

모든 실험결과는 3회 이상 실험을 반복하여 얻은 자료를 이용하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고 통계학적 분석에는 SPSS version 14.0을 이용하였다. 실험 군 간 비교에는 one-way analysis of variance (ANOVA) 및 independent *t*-test를 이용하였고,  $p < 0.05$ 를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

ATX가 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 효과 및 세포생존율

RAW264.7 cell을 이용하여 LPS로 유도된 NO 생성에 대한 ATX의 억제효과를 측정하였다. 대조군과 비교할 때, LPS군 (10  $\mu$ g/ml, 20 hr)은 약 36배의 NO 생성이 증가하였으며, ATX 처리군(25-100  $\mu$ M)은 농도의존적으로 LPS로 유도된 NO의 생성을 유의성 있게 억제하였다[25-100  $\mu$ M ( $p < 0.01$ )](Fig. 1). 또한, ATX의 세포독성효과를 MTT 방법을 이용하여 측정한 결과, 세포생존율은 100  $\mu$ M의 농도에 이르기까지 영향을 받지 않았다(Fig. 2).

ATX가 LPS로 유도된 iNOS 단백질 발현억제에 미치는 효과

ATX를 이용하여 염증인자 NO의 생성억제와 iNOS 단백질 발현억제와의 상관관계를 알아보기 위하여 immunoblot analysis로 단백질발현을 조사한 결과, LPS에 반응한 iNOS 단백질은 현저하게 증가하였으며, ATX는 50 및 100  $\mu$ M의 농도에서

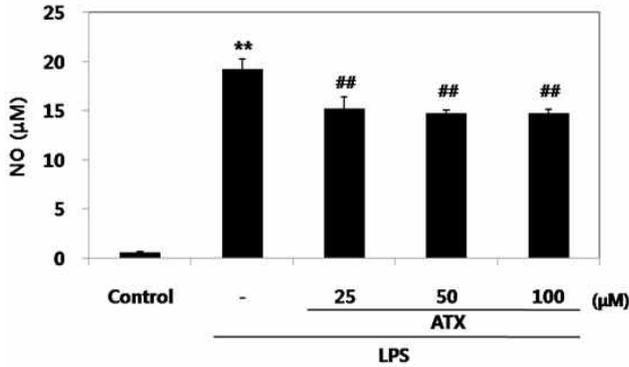


Fig. 1. Inhibitory effects of ATX on NO production by LPS. The RAW264.7 cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were treated with various concentrations of ATX for 1 hr prior to the addition of LPS (10 µg/ml), and then the cells were further incubated for 20 hr. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of NO in culture medium were monitored as described in the methods section. Data represent the mean±SD from three separate experiments. \*\* $p < 0.01$ , significant compared with vehicle-treated control; ## $p < 0.01$ , significant compared with LPS alone.

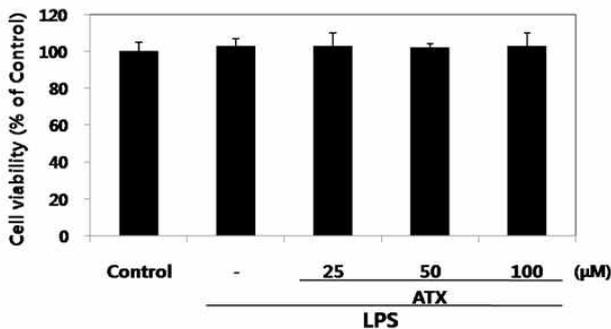


Fig. 2. Cytotoxic effects of ATX in RAW264.7 cells. The cytotoxic effects of ATX in cells were determined by MTT assay. Cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/ml) were treated with various concentrations of ATX for 1 hr prior to the addition of LPS (10 µg/ml), and then the cells were further incubated for 20 hr. Control cells were incubated with vehicle alone. Three independent experiments were performed, and data shown represent the mean±SD.

iNOS 단백질발현을 억제하였다(Fig. 3). 이는 ATX에 의한 NO 생성의 감소가 iNOS 단백질발현의 조절에 의한 것임을 나타낸다.

ATX가 LPS로 유도된 IL-6 및 TNF-α의 생성에 미치는 효과

LPS로 유도된 IL-6 및 TNF-α의 생성에 대한 ATX의 억제효과는 enzyme immunoassay 방법을 이용하여 확인하였으며

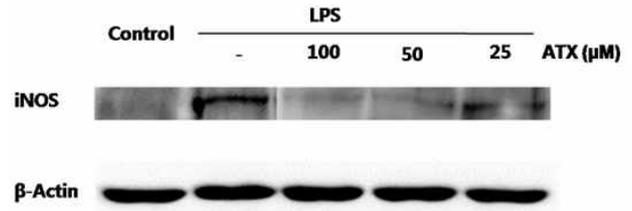


Fig. 3. Inhibitory effects of ATX on iNOS induction by LPS. The RAW264.7 cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were treated with concentrations of ATX (25, 50 and 100 µM) for 1 hr prior to the addition of LPS (10 µg/ml), and then the cells were further incubated for 20 hr. Control cells were incubated with vehicle alone. The protein levels of iNOS were determined by immunoblot analysis. β-Actin was used as a loading control.

LPS 처리군(10 µg/ml, 20 hr)은 대조군과 비교해 약 11배의 IL-6 ( $p < 0.05$ ) 및 약 23배의 TNF-α ( $p < 0.01$ )를 생성함으로써 유의성 있는 증가를 보였다. 또한 LPS로 유도된 IL-6 및 TNF-α 생성에 대한 ATX의 억제효과가 100 µM의 ATX 농도에서 모두 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 나타났다. 특히, 이 농도에서 ATX는 LPS로 유도된 IL-6의 생성을 65.2% 억제시켰고, TNF-α의 생성을 21.2% 억제시켰으므로 IL-6에 있어 약 3배 더 높은 억제효과를 보였다(Fig. 4).

ATX가 LPS로 유도된 NF-κB transcriptional activity에 미치는 효과

ATX가 LPS로 유도된 NF-κB transcriptional activity에 미치는 영향을 조사하였다. NF-κB reporter construct로 transfection된 RAW264.7 cell인 NGL cell을 ATX의 유무 하에 10 µg/ml의 LPS로 처리하여 실험을 진행하였다. ATX 처리군(25-100 µM)은 용량 의존적으로 LPS로 유도된 NF-κB transcriptional activity를 억제하였다. 특히, 100 µM의 ATX 처리는 NF-κB transcriptional activity (NF-κB dependent luciferase activity)를 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 5). 이는 100 µM 농도의 ATX가 NF-κB 활성을 억제하는 것이(Fig. 6) NF-κB transcriptional activity의 억제와 연계됨을 의미한다.

ATX가 LPS로 유도된 NF-κB 활성에 미치는 효과

ATX가 LPS로 유도된 NF-κB 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 immunoblot analysis로 NF-κB (p65 subunit)의 발현수준을 조사하였다. Kim 등[14]은 NF-κB가 LPS 처리 후 30-60분에 활성화 되었다고 보고하였으며, 본 실험도 동일한 양상을 나타내었다. LPS 처리 후, 30 및 60분에서 NF-κB 활성이 나타났으며, 100 µM의 ATX 처리로 억제되었다(Fig. 6). 이 결과는 ATX가 NF-κB 활성을 억제한다는 것을 나타내며, 이는 ATX가 IκBα 분해를 저해하여 NF-κB가 핵으로 전이하는 것을 억제함을 의미한다.

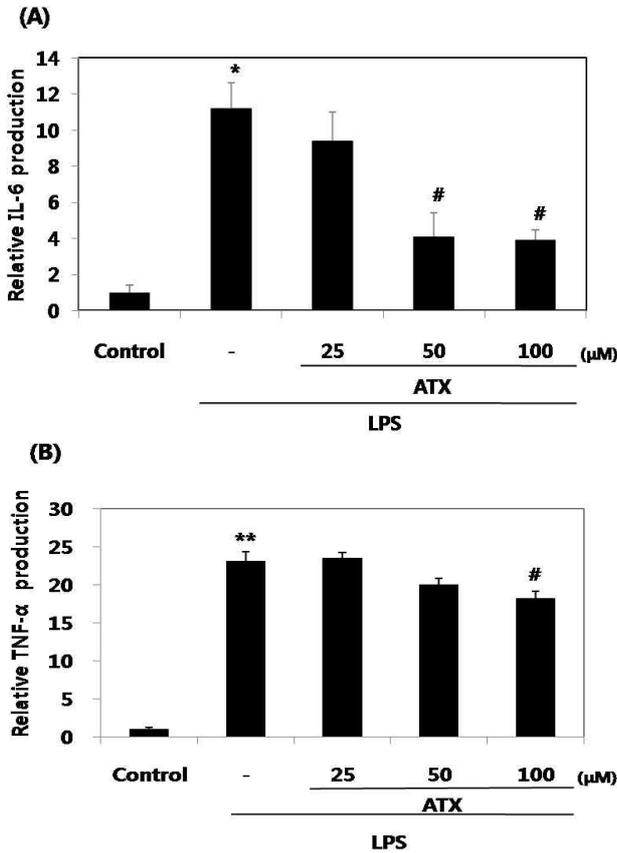


Fig. 4. The inhibitory effects of ATX on LPS-induced production of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF-α) in RAW264.7 cells. The cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were treated with various concentrations of ATX for 1 hr prior to the addition of LPS (10 μg/ml), and then the cells were further incubated for 20 hr. Control cells were incubated with vehicle alone. The levels of proinflammatory cytokines were measured by ELISA (A and B). Data represent the mean±SD from three separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significant compared with vehicle-treated control; # $p < 0.05$ , significant compared with LPS alone.

Superoxide radical 소거활성에 의한 ATX와 α-tocopherol의 항산화능 비교

비효소적 superoxide radical 생성제인 NADH/PMS에서 superoxide radical의 소거능은 ATX의 경우 0.01-5 mg/ml의 농도에서 농도 의존적으로 소거되는 경향을 나타내었으며, positive control인 α-tocopherol에서도 동일한 양상을 나타내었다. 또한 5 mg/ml의 농도에서 ATX는 α-tocopherol에 비해 superoxide radical 소거능이 1.33배 더 높았다(Fig. 7).

ROS의 생성에 미치는 ATX의 효과

ATX의 항산화작용(Fig. 7)이 세포 내에서 발생하는 ROS 수준에 있어서도 동일한 양상을 나타내는 지를 조사하기 위해 대식세포인 RAW264.7 cell을 이용하여 실험을 수행하였다.

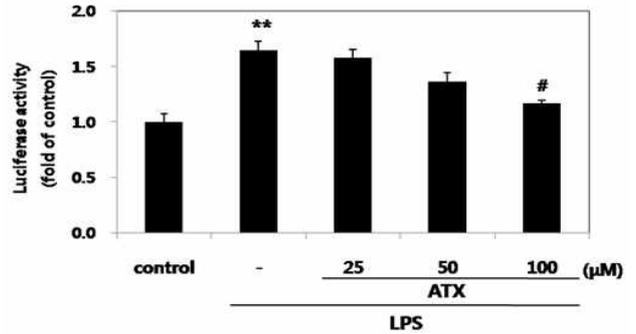


Fig. 5. Inhibitory Effects of ATX on LPS-Induced NF-κB Transcriptional Activity. RAW264.7 cells were transfected with an NF-κB reporter construct as described in the methods section and then either untreated (control) or pretreated with different concentrations (25-100 μM) of ATX for 1 hr. LPS (10 μg/ml) was then added and cells were further incubated for 24 hr. Cells were then lysed and luciferase activities were determined using a Promega luciferase assay system and a luminometer. Data represent the mean±SD from three separate experiments. \*\* $p < 0.01$ , significant compared with vehicle-treated control; # $p < 0.05$ , significant compared with LPS alone.

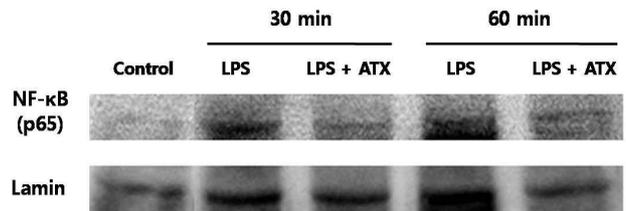


Fig. 6. The inhibitory effects of ATX on NF-κB (p65 subunit) activation by LPS. The RAW264.7 cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were treated with ATX (100 μM) for 1 hr prior to the addition of LPS (10 μg/ml), and then the cells were further incubated for 30 and 60 min. Control cells were incubated with vehicle alone. Nuclear extracts for NF-κB were prepared as described in the methods section. The protein levels of NF-κB were determined by immunoblot analysis. Lamin A/C was used as a loading control.

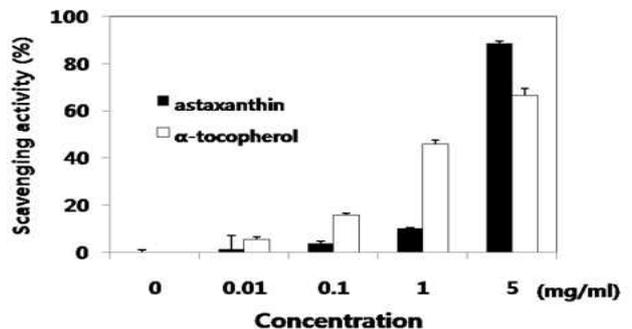


Fig. 7. Superoxide radical scavenging activity of astaxanthin and α-tocopherol. Data represent the mean±SD from three separate experiments.

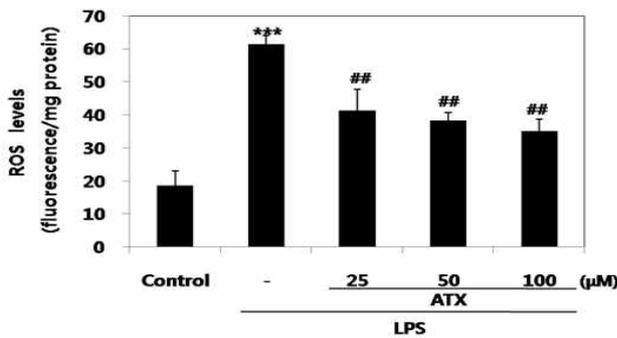


Fig. 8. Effects of ATX on ROS generation. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of ATX (25-100 μM) for 1 hr prior to the addition of LPS (10 μg/ml), and then the cells were further incubated for 24 hr. Control cells were incubated with vehicle alone. Cell lysates were incubated with DCFH-DA for 30 min and intracellular levels of ROS were measured by fluorescence spectrophotometer (Ex: 485 nm; Em: 530 nm). Data represent the mean±SD from three separate experiments. \*\*\**p*<0.001, significant compared with vehicle-treated control; ##*p*<0.01, significant compared with LPS alone.

LPS 처리군은 대조군에 비해 약 3.3배의 ROS 생성량이 증가하였으며, 이러한 ROS의 증가는 ATX에 의해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 8). 즉, ATX 처리군(25-100 μM)은 농도 의존적으로 LPS로 유도된 ROS 생성을 유의성 있게 억제하였다 (*p*<0.01).

### 고 찰

염증, 자가면역질환, 암, 노화, 뇌혈관질환, 심혈관계질환 등의 원인이 ROS인 free radical (hydroxyl 및 peroxy radicals) 및 singlet oxygen 생성에 관련이 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 항산화 효능을 가지는 식품의 섭취를 통해 노화를 지연시키고, 여러 가지 질병을 예방 및 치료하고자 하는 노력이 증가하고 있다. 이러한 질병들을 일으키는 ROS는 매우 불안정하고 반응성이 아주 강해 세포내 단백질, 당 및 지방산은 물론이고, 유전정보를 함유한 DNA 까지도 산화적 손상을 입히며, 결과적으로 이러한 손상은 세포에 치명적인 피해를 입혀 세포가 기능을 잃거나 암세포로 변형되는 것으로 알려져 있다 [10,28].

NO는 세포 내에서 다양하게 작용한다. 즉, cNOS는 일정한 양의 NO를 생산하므로 신경시스템에서 신호전달을 위해 작용을 하거나 혹은 혈관을 확장하여 혈압을 조정하므로 세포의 항상성에 기여한다. 반면에, iNOS는 LPS로 처리된 대식세포에서 많은 양의 NO를 생성하므로 세포에 손상을 초래하며 [33], 다양한 급성 및 만성적 염증상황에서 병리학적인 과정에 관여 할 수 있다[13]. 생성된 NO 양을 Griess 시약으로, iNOS 단백질발현을 immunoblot으로 분석한 결과, ATX는 LPS로

유도된 NO 생성 및 iNOS 단백질발현 수준을 현저히 억제시켰다. 이는 ATX가 iNOS의 기능을 제어하여 NO 생성을 감소시키므로 신경질환[2]을 포함하는 염증성 질병의 치료에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

염증성 cytokine인 IL-6와 TNF-α는 면역학적 기능이 다양할 뿐 아니라 target cell과 상호작용을 하며[6] 염증을 매개하고 조절한다. 또한, 다른 면역세포들을 활성화시키고 류마티스성 관절염 같은 염증성 질병을 일으킬 수 있다[11]. 특히, IL-6는 주로 단핵구나 대식세포에서 분비되며 증식하는 B 세포가 형질세포로 전환되는 마지막 분화단계를 증진시키고, 항체분비를 자극하는 것으로, 이 cytokine의 수준은 염증성 병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다[7]. 최근에, 약초들의 추출성분을 이용하여 IL-6 및 TNF-α [15]와 같은 염증성 사이토카인을 억제시킴으로 염증성 질환을 치료하는 새로운 연구영역이 확대되고 있다. LPS로 대식세포를 자극하면 많은 양의 IL-6 및 TNF-α가 방출되며, 이러한 cytokine들에 대한 ATX의 억제효과를 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. LPS는 IL-6 및 TNF-α의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, ATX (100 μM)는 LPS로 유도된 IL-6 및 TNF-α의 생성을 유의성 있게 억제시켰다. 특히, 이 농도에서 ATX는 LPS로 유도된 IL-6 및 TNF-α 생성을 각각 65.2%, 21.2% 억제시킴으로 IL-6에 있어 약 3배 더 높은 억제효과를 보였다.

NF-κB는 면역반응, 세포사멸 및 cell cycle에 관련된 유전자 발현을 조절하는 편재된 전사인자이며, iNOS, COX-2, IL-1β 및 TNF-α를 포함하는 많은 염증성 유전자들의 발현을 조절한다[23]. 그리고 이 전사인자의 비정상적인 활성화는 다양한 염증성질환과 종양생성에 관련되며, 항염증 약제들은 NF-κB 경로를 조절할 수 있다[5]. 또한 이 전사인자의 활성화를 억제하는 것은 암과 염증성질환의 예방과 치료에 효과적인 것으로 보고되었다[1]. NO, IL-6 및 TNF-α를 억제하는 분자적인 기작을 이해하기 위해 LPS로 유도된 NF-κB 활성화에 대한 ATX의 효능을 immunoblot으로 분석한 결과, ATX가 LPS로 유도된 NF-κB 활성을 효과적으로 억제하였다. 이러한 결과는 ATX가 LPS로 유도된 대식세포에서 NF-κB 경로를 조절할 수 있다는 것을 의미한다. NF-κB 경로는 iNOS 발현의 조절에 관련되며, 몇몇 화학항암제인 phytochemicals는 과도한 이 전사인자의 활성을 억제하므로 iNOS 발현을 억제한다[32]. 또한 이 경로는 LPS로 자극된 세포에서 염증성 cytokine들의 방출을 조절하는 핵심 조정자이다[20]. 더욱이 NF-κB dependent luciferase assay로 측정된 결과, ATX (100 μM)는 LPS로 유도된 luciferase 활성을 현저히 억제하였다. 결과를 종합해 볼 때, ATX로 NF-κB transcriptional activity를 억제시키는 것이 NF-κB의 활성억제와 연계됨을 시사한다. 이러한 현상은 iNOS, IL-6, TNF-α 및 ROS의 유도에 대한 억제와 밀접하게 관련되어 있다. 이는 ATX가 NF-κB p65 subunit의 핵 전위 및 IκBa의 분해를 억제하여 염증성 매개자들의 생성을 저해한다는 Lee 등 [22]의 보고와 일치한다.

Superoxide radical은 산소분자가 한 개의 전자에 의해 환원된 형태를 가진 것이며, 대부분의 산화반응은 이 radical이 생성되는 반응경로와 긴밀히 연관되어 있다. 또한 이 radical은 항상 과산화수소와 산소를 생성하게 하는 반응 중간체로서 작용하여 다양한 다른 활성산소 화학종들의 생성과 직접 관련되어 있다. 더욱이 활성산소의 일종인 이 radical은 DNA를 손상시켜 류마티스성 관절염, 동맥경화증, 심근경색증 및 암을 유발할 수 있고[25], 또한 생물체의 노화와의 관련성이 보고되고 있다[8]. ATX가 superoxide radical과 반응하여 이를 얼마나 감소시키는지를 조사한 결과, 5 mg/ml의 ATX가 동일농도의  $\alpha$ -tocopherol에 비해 superoxide radical 소거능이 더욱더 높은 것으로 나타났으며, 이는 ATX가 강력한 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 보다 더 우수한 항산화제라는 것을 의미한다. 또한, Ma와 Kinneer [24]는 LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 활성이 phenolic antioxidants에 의해 억제된다고 보고하였다. 이는 항산화제가 세포의 신호전달체계에서 항염증제와 거의 같은 역할을 담당할 수도 있다는 것을 시사한다. DCFH-DA를 이용한 ROS 측정결과, ATX는 세포내부의 ROS 축적을 강력하게 제거하였다. 이러한 ATX의 항산화효능이 NF- $\kappa$ B 활성을 억제시키는 이 물질의 항염증효과와 상호 깊은 연관성이 있을 것으로 사료된다. 또한 Sanlioglu 등[30]은 세포내부의 ROS 증가가 IKK의 활성을 높혀 NF- $\kappa$ B 활성을 증가시킨다고 보고하였다. 그러므로 ROS는 NF- $\kappa$ B의 활성화 및 NO, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 생성에 있어 중요한 원천물질일 가능성이 있다.

결론적으로, 미세조류 유래 생리활성물질인 ATX가 우수한 superoxide radical 소거제이며, LPS로 유도된 대식세포에서 ROS의 생성 및 NF- $\kappa$ B 활성을 저해하므로 iNOS의 발현 및 NO, IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성이 억제됨을 확인 할 수 있었다. 따라서 ATX를 이용한 항염증제, 항산화제 및 항암치료제 등의 개발가능성을 제시한다.

## 감사의 글

본 연구는 부산광역시 신성장산업과와 중소기업 산학연협력 기업부설연구소 설치지원사업의 지원을 받아 수행하였습니다.

## References

- Aggarwal, B. B. 2004. Nuclear factor- $\kappa$ B: The enemy within. *Cancer Cell* **6**, 203-208.
- Albina, J. L. and J. S. Reichner. 1998. Role of nitric oxide mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metast Rev* **17**, 39-53.
- Bendich, A. 1991. Non vitamin a activity of carotenoids: immuno enhancement. *Food Sci. Technol. Res* **2**, 127-130.
- Bennedsen, M., X. Wang, R. Willen, T. Wadstrom, and L. P. Andersen. 1999. Treatment of H. pylori infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunol. Lett.* **70**, 185-189.
- Berg, J., H. Fellier, T. Christoph, J. Grarup, and D. Stimmeder. 1999. The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 *in vitro*. *Inflamm. Res.* **48**, 369-379.
- Beutler, B. and A. Cerami. 1989. The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 625-655.
- Delgado, A. V., A. T. McManus, and J. P. Chambers. 2003. Production of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin 1- $\beta$ , Interleukin 2, and Interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to Substance P. *Neuropeptides* **37**, 355-361.
- Fridovich, I. 1997. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem* **272**, 18515-18517.
- Ghosh, S. and M. Karin. 2002. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* **109**, S81-S96.
- Guerin, M., M. E. Huntley, and M. Olaizola. 2003. Haematococcusastaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* **21**, 210-216.
- Guslandi, M. 1998. Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**, 904-907.
- Guzik, T. J. and K. M. Channon. 2005. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence. *Method Mol. Med* **108**, 73-89.
- Kilbourn, R. G. and P. Belloni. 1990. Endothelial cell production of nitric oxide in response to interferon- $\gamma$  in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 772-776.
- Kim, S. G., H. J. Kim, S. H. Choi, and J. Y. Ryu. 2000. Inhibition of lipopolysaccharide-induced I- $\kappa$ B degradation and tumor necrosis factor-expression by dimethyl-4, 40-dimethoxy-5, 6, 50, 60-dimethylene dioxybiphenyl-2,20-dicarboxylate (DDB): minor role in hepatic detoxifying enzyme expression. *Liver* **20**, 319-329.
- Kim, S. J., H. J. Jeong, P. D. Moon, K. M. Lee, H. B. Lee, H. J. Jung, S. K. Jung, H. K. Rhee, D. C. Yang, S. H. Hong, and H. M. Kim. 2005. Anti-inflammatory activity of gumi-ganghwaltang through the inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation in peritoneal macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 233-237.
- Kim, Y. W., R. J. Zhao, S. J. Park, J. R. Lee, I. J. Cho, C. H. Yang, S. G. Kim, and S. C. Kim. 2008. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Brit. J. Pharmacol.* **154**, 165-173.
- Krinsky, N. I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Bio Med* **7**, 617-635.
- Kurashige, M., E. Okimasu, M. Inoue, and K. Utsumi. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem Phys. Med. NMR.* **22**, 27-38.
- Kurihara, H. 2002. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancermetastasis in mice treated with restraint stress. *Life*

- Sci.* **70**, 2509-2520.
20. Lappas, M., M. Permezel, H. M. Georgiou, and G. E. Rice. 2002. Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues *in vitro* *Biol. Reproduct.* **67**, 668-673.
  21. Lee, A. K., S. H. Sung, Y. C. Kim, and S. G. Kim. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappa B alpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Brit. J. Pharmacol.* **139**, 11-20.
  22. Lee, S. J., S. K. Bai, K. S. Lee, S. Namkoong, H. J. Na, K. S. Ha, J. A. Han, S. V. Yim, K. Chang, Y. G. Kwon, S. K. Lee, and Y. M. Kim. 2003. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing IκB kinase-dependent NF-κB activation. *Mol. Cells* **16**, 97-105.
  23. Li, Q. and I. M. Verma. 2002. NF-κB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725-734.
  24. Ma, Q. and K. Kinneer. 2002. Chemo-protection by phenolic antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor-α induction in macrophages. *J. Biol. Chem.* **277**, 2477-2484.
  25. Miesel, R., M. P. Murphy, and H. Kroeger. 1996. Enhanced mitochondrial radical production in patients with rheumatoid arthritis correlates with elevated levels of tumor necrosis factor alpha in plasma. *Free Radical Res.* **25**, 161-9.
  26. Naguib, Y. M. A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agr. Food Chem.* **48**, 1150-1154.
  27. Palozza, P. and N. I. Krinsky. 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 291-295.
  28. Papas, A. M. 1999. Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health, CRC Press.
  29. Rachmilewitz, D., J. S. Stampler, F. Karmeli, M. E. Mullins, D. J. Singel, J. Loscalzo, R. J. Xavier, and D. K. Podolsky. 1993. Peroxynitrite-induced rat colitis- a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology* **105**, 1681-1688.
  30. Sanlioglu, S., C. M. Williams, L. Samavati, N. S. Butler, G. Wang, P. B. McCray, T. C. Jr. Ritchie, G. W. Hunninghake, E. Zandi, and J. F. Engelhardt. 2001. Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-α secretion through IKK regulation of NF-κB. *J. Biol. Chem.* **276**, 30188-30198.
  31. Shimidzu, N., M. Goto, and W. Miki. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish Sci.* **62**, 134-137.
  32. Surh, Y. J., K. S. Chun, H. H. Cha, S. S. Han, Y. S. Keum, K. K. Park, and S. S. Lee. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268.
  33. Tomē, L. A., L. Yu, I. de Castro, S. B. Campos, and A. C. Seguro. 1999. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia. *Nephrol. Dial. Transpl.* **14**, 1139-1145.
  34. Yonouchi, J. 1993. Astaxanthin enhances *in vitro* antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. *Nutr. Cancer* **19**, 269-280.

초록 : 미세조류 유래 astaxanthin의 항염증 및 항산화 효과

곽태원<sup>1</sup> · 차지영<sup>1</sup> · 이철원<sup>2</sup> · 김영민<sup>3</sup> · 유병홍<sup>3</sup> · 김성구<sup>3</sup> · 김종명<sup>4</sup> · 박성하<sup>1</sup> · 안원근<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 한의학전문대학원, <sup>2</sup>부산대학교 해양생물기술연구소, <sup>3</sup>(주)바이오포트코리아, <sup>4</sup>부경대학교 수산과학대학)

Astaxanthin (ATX)은 다양한 생명체에서 생성되는 카로티노이드 색소이다. 본 연구에서는 ATX가 RAW264.7 cell에서 LPS에 의한 inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitric oxide (NO), 염증성 사이토카인, nuclear factor-kappa B (NF-κB)와 reactive oxygen species (ROS)의 생성을 억제 시키는 지 또한, superoxide radical 소거능이 있는 지를 조사하였다. iNOS와 NF-κB는 immunoblot analysis로, interleukin (IL)-6와 tumour necrosis factor-α (TNF-α)는 ELISA 법으로 분석하였다. NO 양은 nitrite의 양을 측정하였고, ROS는 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 법으로 superoxide radical 소거능은 superoxide radical scavenging activity assay로 검증하였다. 100 μM의 ATX 농도에서 LPS로 유도된 NO, IL-6 및 TNF-α 같은 염증성 사이토카인의 생성 뿐만 아니라 iNOS 및 NF-κB의 발현도 억제되었다. 특히, IL-6 및 TNF-α 생성에 있어 ATX의 최대 억제율은 각각 65.2% 및 21.2% 이었으며 LPS로 유도된 NF-κB의 전사활성을 억제하였다. 이러한 현상은 세포질에서 핵으로 NF-κB의 전위를 억제하는 것과 관련이 있다. 또한, 25-100 μM의 ATX 농도에서 세포 내 ROS 생성을 억제하였으며, 5 mg/ml 농도의 ATX는 동일농도의 α-tocopherol에 비해 superoxide radical 소거능이 1.33배 높았다. 이러한 결과들은 ATX가 대식세포에서 ROS 생성 및 NF-κB 활성을 저해하므로 iNOS의 발현, NO 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제하며, 또한 우수한 superoxide radical 소거능을 보유한다는 것을 나타내었다. 결론적으로, ATX가 항염증제 및 항산화제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.