

투스 열수 추출물이 마우스 비장세포 증식증과 염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비에 미치는 영향

박현진¹ · 류혜숙^{2*}

¹ICAN 영양연구소

²상지대학교 보건과학대학 식품영양학과

Effect of *Hizikia fusiforme* Water Extracts on Splenocyte Proliferation and Cytokine Production in Mice

Hyunjin Park¹ and HyeSook Ryu^{2*}

¹ICAN Nutrition Education and Research, Seoul 150-877, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, College of Health Sciences, Sangji University, Gangwon 220-702, Korea

ABSTRACT *Hizikia fusiforme* (seaweed *fusiforme*) has long been used as a food source mainly in Korea and Japan. This study was performed to evaluate the immunomodulative effects of *Hizikia fusiforme* in mice. *Hizikia fusiforme* water extracts (0, 50, and 500 mg/kg b.w.) were orally administrated into the mice every other day, for four weeks. The proliferation of splenocytes, as well as the levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) secreted by activated macrophages were measured. Splenocyte proliferation was enhanced in the experimental groups compared to that of the control group. Also, the mice with *Hizikia fusiforme* water extracts supplementation in both concentrations showed increased levels of cytokine production by activated peritoneal macrophages compared to those in the control group. The highest levels of cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) production were observed in the 50 mg/kg b.w. supplementation group stimulated by LPS for all three cytokines. The results of this study showed that the supplementation of *Hizikia fusiforme* water extracts may enhance the immune function by regulating the splenocytes proliferation and the cytokine production by activated macrophages. Further studies are needed to identify the stimulative and immunomodulating components of *Hizikia fusiforme*.

Key words: *Hizikia fusiforme*, immune function, splenocytes proliferation, cytokine production, mice

서 론

최근 들어 해양 동물, 해조류, 해양미생물 등에서의 생리 활성물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며(1-4), 그 중 해조류의 대사 작용 개선효과가 여러 차례 보고된 바 있다. 해조류에 풍부한 저칼로리의 다당류는 식이성 섬유질의 역할을 하여 정장작용과 유독물질의 제거효과가 있을 뿐만 아니라, 다양한 해조류가 항암, 항박테리아, 항당뇨, 지질대사개선, 항산화 등의 효과가 있는 것으로 선행 연구 결과 발표된 바 있다(5-8). 그중 툃(*Hizikia fusiforme*)은 미역, 다시마, 모자반 등과 함께 갈조류(*Phaeophyta*)에 속하며 우리나라의 서해안, 남해안 및 제주도에서 서식하는 천연자원식물이다. 주로 일본과 우리나라에서 식용으로 사용되며 섬유소와 각종 필수 미네랄이 풍부하게 함유되어 있어 변비 해소, 칼슘 보충제로서의 역할, 소화 증진제 등으로 활용되어 왔다. 선행연구에서 툃의 항응고(9), 항산화 및 항염증 효과

(10,11), 골대사와 지방대사에 미치는 영향(12), 항고지혈증 및 항동맥경화증 효능(13) 등에 대해 보고된 바 있으며, 특히 최근에는 항암 효과에 대하여 다양한 연구들이 시행된 바 있다(14-18). 이러한 선행 연구의 경향을 분석해보면, 툃을 비롯한 해조류 다당류의 자유라디칼 소거능에 기인한 항산화 작용에 대한 연구를 시작으로 암세포에 툃으로부터 분리된 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone(19)을 처리했을 때의 세포자멸사 촉진, nitric oxide 생성 억제 등으로 이어져 진행되고 있으며, 이는 항후 퇴행성 질환, 자가면역 질환, 항암 효과 규명에 이르기까지 툃의 생리활성 효과를 밝히고 생리활성물질을 규명하고자 하는 연구들이 지속적으로 진행될 것임을 시사하고 있다. 하지만 이러한 툃의 생리활성 기능에 대한 연구의 대부분이 항균, 항산화, 항암에 관해 집중되어 있으며, 면역능 조절 및 개선에 미치는 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 천연자원 식용 해조류인 툃의 면역증강효과를 알아보고자 툃 열수 추출물을 마우스에 4주간 격일로 경구투여 하여 비장세포 증식능과 활성 폭강 대식세포에서 분비하는 사이토카인(interleukin(IL)-1 β , IL-6, tu-

Received 19 August 2013; Accepted 23 November 2013

*Corresponding author.

E-mail: rhs7420@sangji.ac.kr, Phone: 82-33-738-7641

mor necrosis factor(TNF)-α) 분비량을 관찰하였다. 본 연구를 통하여 뿔 추출물의 면역증진효과를 규명함으로써 새로운 천연 산물로서의 뿔을 재조명하며 이를 이용한 기능성 식품 개발 등 훗날 식품 산업에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

재료 및 방법

시료추출 및 실험동물

기존 연구(10,20)에서 사용된 추출법과 동일하게 동결 건조된 뿔 시료를 증류수로 환원 냉각시키면서 80°C 수욕상에서 3시간씩 3회 반복 추출한 후 감압 농축하여 물 추출물을 얻어 경구투여 시료로 이용하였다. 본 연구에서 사용된 추출법은 기존 연구에서 사용된 추출법을, 본 연구에 사용된 동물은 7~8주령 암컷 Balb/c mouse를 (주)대한실험동물센터(Eumsung, Korea)로부터 분양받아 고형 사료와 물을 자유로이 공급하면서 7~8일 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후 체중이 15 g 내외인 마우스를 실험에 사용하였다. 실험 동물실 온도는 22±2°C, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암주기(light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하였다. 식이 섭취량은 매일 측정하였으며 체중은 1주일에 한번 측정하였다. 모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals(1996, USA)"에 준하여 취급하였다.

시약 및 배지

본 연구에 사용된 배지는 RPMI medium 1640의 GIBCO BRL(Erie, NY, USA) 제품을 사용하였고, fetal bovine serum(FBS), lipopolysaccharide(LPS), concanavalin A (ConA), thioglycollate, sodium bicarbonate, ammonium chloride, TRIZMA[®]base, TRIZMA[®]hydrochloride, trypan blue solution(0.4%), DMSO(dimethyl sulfide), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 등의 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

시료 수집 및 전처리

식이실험 종료 후 실험동물은 12시간 절식시킨 후 에테르 마취하에 개복하여 심장 천자(heart puncture)에 의해 채혈하고 비장을 채취하였다. 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 전혈을 4°C, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 혈청을 분리한 뒤 분석 시까지 -70°C에 보관하였다.

비장세포 증식능 측정

비장세포 증식능 측정은 MTT assay를 이용하였다. 각 군별로 마우스 비장세포 현탁액을 5.0×10⁶ cell/mL가 되도록 희석하여 96-well plate의 각 well에 90 μL씩 분주하였다. 또한 mitogen으로 Con A(5 μg/mL), LPS(15 μg/mL)를 10 μL씩 분주하고 이에 대한 대조군으로는 mitogen 대신

세포 배양액(10% FBS-RPMI 1640)을 동량 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator(Sanyo, Osaka, Japan)에서 44시간 배양 후 MTT를 10 μL 가하고, 암조건에서 4시간 동안 다시 배양하여 formazan crystal 형성을 유도하였다. 4시간 후 상층액을 제거하고 각 well에 150 μL의 DMSO(Sigma-Aldrich Co.)를 가하여 10분간 방치한 후 ELISA reader (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 비장세포의 증식능은 다음의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation index} = \frac{\text{Sample의 흡광도}}{\text{Media control의 흡광도}}$$

혈중 사이토카인 분비능 측정

뿔 추출물을 경구투여한 마우스의 복강 내 대식세포를 추출하여 배양시킨 다음 배양 상층액으로부터 분비되는 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α) 분비량을 각각 측정하였다. 비부착성 세포를 제거하고 부착성 세포만을 얻은 후, 10%-FBS RPMI 1640 900 μL와 대식세포를 활성화시키는 mitogen인 LPS와 배지를 100 μL 가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator(Sanyo)에서 48시간 배양하였다. 마우스 복강 대식세포의 IL-1β, IL-6, TNF-α 함량은 ELISA cytokine kit(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate의 각 well에 biotinylated antibody reagent 50 μL를 넣고 recombinant murine IL-1β, IL-6, TNF-α 또는 뿔 추출물을 첨가하여 배양시킨 배양 상층액을 50 μL씩 넣고 실온(20~25°C)에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 완충용액으로 3회 세척하고 aspiration을 한 후, streptavidin-HRP solution을 각 well에 100 μL 가해 30분간 실온에서 배양하고, 각 well에 TMB substrate solution 100 μL를 첨가하여 30분간 암실 배양 후 stop solution을 가해 반응을 정지시켰다. 반응 정지 30분 이내에 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard 사이토카인을 이용하여 작성한 표준곡선을 이용하여 각 well의 사이토카인 분비 농도를 계산하였다.

통계

모든 과정은 3반복으로 이루어졌으며 연구 결과의 자료는 통계 프로그램인 SAS 9.1(Statistic Analysis System, Cary, NC, USA)을 이용하여 평균 및 표준편차를 계산하였다. 각 군내의 비교에서 각각의 요인은 분산분석(analysis of variance, ANOVA) 및 Duncan's multiple range test를 사용하여 α=0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향

본 연구에서는 뿔 열수 추출물의 경구투여가 마우스 비장

Table 1. Proliferation index of splenocytes of mice orally administered with *Hizikia fusiforme* water extracts for 4 weeks¹⁾

Conc. (mg/kg b.w.)	Splenocyte proliferation index ²⁾		
	Without mitogen	Con A	LPS
0 (control)	1 ^b	3.72±0.18 ^c	2.59±0.13 ^b
50	1.19±0.03 ^a	5.73±0.37 ^a	3.60±0.12 ^a
500	1.30±0.09 ^a	5.18±0.15 ^b	3.40±0.03 ^a

¹⁾Proliferation index=mean of O.D. in test wells/ mean of O.D. in control wells.

²⁾Means with different letters (a-c) in a column are significantly different at $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

세포 증식능에 미치는 영향을 검색하기 위한 지표로 MTT assay를 이용하여 비장세포 증식능을 측정하였고 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 톳 열수 추출물을 50 mg/kg b.w. 혹은 500 mg/kg b.w.의 농도로 투여한 실험군과 식염수를 투여한 대조군의 비장세포 증식능을 측정하였으며 mitogenic effect test로는 Con A(5 µg/mL)와 LPS(15 µg/mL)를 첨가하여 사용하였다. 비장세포 증식능은 식염수를 투여한 대조군을 1로 하여 비교하였다.

4주 투여 후 50 mg/kg b.w.와 500 mg/kg b.w. 투여군에서 대조군 대비 각각 1.19±0.03, 1.30±0.09로 대조군에 비해 유의적인 증식능 증가를 나타냈다. Mitogen에 대한 반응을 보면, 세포성 면역과 관련 있는 T세포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 Con A 첨가시 50 mg/kg b.w. 농도군에서 5.73±0.37, 500 mg/kg b.w. 농도군에서는 5.18±0.15로 대조군에 비해 유의적으로 높은 증식능을 나타냈다. 체액성 면역과 관련이 있는 B세포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 LPS 첨가 시에도 50 mg/kg b.w.와 500 mg/kg b.w. 투여군에서 대조군보다 유의적으로 높은 증식능을 나타냈다.

과래에서 추출한 당단백질은 종양을 가진 마우스의 백혈구를 65.11% 증가시켰으며, 곤피 또한 비장무게를 4.84% 증가시킨 것으로 보고된 바 있다(21). 또한 과래, 곤피의 당 함량은 각각 52.20%, 48.16%이었고 이를 구성하는 당류는 fructose의 함량이 곤피에서 84.62%로 가장 높았다. 청각과 김에서 추출한 당단백질이 면역활성에 미치는 영향을 검색한 결과 백혈구 수가 청각의 경우 83.28%로 가장 높게 증가하였으며 당의 함량은 청각과 김에서 각각 60.26%, 56.78%였으며, 이를 구성하는 당류는 fructose의 함량이 가장 많았다. 단백질의 함량은 청각 6.07%, 김은 2.46%로 보고된 바 있다(22).

Lee(23)의 연구에 의하면 톳 열수 추출물은 30.7%의 당과 23.9%의 단백질을 함유하고 있고 당의 대부분은 산성당(87.3%)으로 구성되어 있으며, 구성당 조성의 경우 mannose가 39%로 가장 높았고 fucose는 28.5%, galactose 13.6%, xylose 9.3%, glucose 7.5%의 순이었다고 보고하였다. 이러한 결과로 볼 때 열수 추출물에 녹아난 톳의 당성

분이 면역증강에 영향을 미친 것으로 예측된다.

또 다른 선행연구에서 황금 추출물을 투여한 비장세포 증식능은 mitogen으로 자극하지 않거나 Con A, LPS로 자극한 모든 군에서 대조군에 비해 현저하게 증식능이 상승하였으며, 특히 Con A로 자극한 경우 300%에 가까운 증식향진을 보인 것으로 보고한 바(24) 본 연구 또한 이러한 선행연구와 유사한 경향을 나타냈다.

이상으로 톳 열수 추출물의 경구투여가 비장세포 증식능에 미치는 영향에 대한 검색 결과 대조군에 비해 비장세포 증식을 촉진시킨다고 할 수 있으며 이는 *in vitro*에서 톳 열수 추출물이 마우스의 비장세포 증식을 촉진시켰다는 결과와 일치하였다(20). 선행연구에서는 특히 50 mg/kg b.w. 농도로 경구 투여한 군에서 비장세포 증식능이 최대를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. Con A나 LPS의 자극에 의한 비장세포의 증식이 톳 열수 추출물 첨가군(50 mg/kg b.w., 500 mg/kg b.w.)에서 유의적으로 높은 것으로 보아 B세포와 T세포의 면역반응을 활성화시키는 것으로 생각된다. 따라서 톳 열수 추출물은 T세포와 B세포에서 과생되는 면역세포를 성숙 변화시켜 면역활성을 촉진시키고 이로 인해 체액성 면역과 세포성 면역에 관여하여 면역기능을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

사이토카인 분비능에 미치는 영향

본 실험에서는 톳 열수 추출물을 50 mg/kg b.w.와 500 mg/kg b.w.의 농도로 경구투여한 마우스로부터 복강 대식세포를 분리해 낸 다음 활성화된 대식세포가 생성해 낸 IL-1β(Table 2), IL-6(Table 3), TNF-α(Table 4)의 분비량을 측정하였고 각 군별 양의 대조군으로는 LPS(15 mg/mL)로 자극한 대식세포로부터 분비된 사이토카인 생성량을 측정함으로써 대식세포의 활성화에 대한 지표로 삼았다.

본 실험 결과 톳 열수 추출물을 경구투여한 마우스의 대식세포에서 IL-1β의 분비량은 LPS로 처리하지 않은 경우 500 mg/kg b.w.(71.33±1.00 pg/mL) 농도에서 유의적으로 높게 나타났으며 LPS 처리 시에도 같은 경향을 보였다(Table 2). IL-6 분비량의 경우 LPS로 처리하지 않은 경우

Table 2. IL-1β production by activated peritoneal macrophages of mice orally administered with different levels of *Hizikia fusiforme* water extracts for 4 weeks¹⁾

Conc. (mg/kg b.w.)	IL-1β production (pg/mL) ²⁾	
	Without mitogen	LPS treated
0 (control)	32.47±0.68 ^b	710.69±5.60 ^b
50	32.47±0.83 ^b	716.90±3.15 ^b
500	71.33±1.00 ^a	866.34±4.71 ^a

¹⁾Macrophages were incubated with or without (control) *Hizikia fusiforme* water extracts for 48 hr. Levels of cytokine were determined by triplicates cultured supernatant cells and values are mean±SD.

²⁾Means with different letters (a-c) in a column are significantly different at $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

Table 3. IL-6 production by activated peritoneal macrophages of mice orally administered with different levels of *Hizikia fusiforme* water extracts for 4 weeks¹⁾

Conc. (mg/kg b.w.)	IL-6 production (pg/mL) ²⁾	
	Without mitogen	LPS treated
0 (control)	232.01±5.10 ^a	926.66±7.20 ^c
50	127.92±7.00 ^b	1,122.10±12.00 ^a
500	231.60±3.54 ^a	959.24±10.11 ^b

¹⁾Macrophages were incubated with or without (control) *Hizikia fusiforme* water extracts for 48 hr. Levels of cytokine were determined by triplicates cultured supernatant cells and values are mean±SD.

²⁾Means with different letters (a-c) in a column are significantly different at $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

50 mg/kg b.w. 농도 투여군은 대조군보다 낮은 생성량을 보였으며, LPS 첨가 시에는 50 mg/kg b.w.와 500 mg/kg b.w. 농도군 모두 1,120.10±12.00 pg/mL, 959.24±10.11 pg/mL로 대조군에 비해 유의적으로 높은 생성능을 보였다 (Table 3). TNF- α 분비량의 경우 LPS로 처리하지 않은 경우 500 mg/kg b.w.(236.49±4.52 pg/mL)의 농도에서 대조군(186.67±9.60 pg/mL)보다 유의적으로 높은 생성을 보였고 LPS 첨가 시에는 50 mg/kg b.w.의 농도에서 708.51±7.70 pg/mL로 대조군(676.57±9.35 pg/mL)에 비해 유의적으로 높은 TNF- α 생성량을 나타냈다(Table 4).

외부 항원에 대한 면역반응은 여러 면역세포의 상호작용에 달려있으며 이러한 세포간의 협력은 사이토카인이 중재하므로 증재자의 생성과 분비는 중요한 의미를 가지게 된다. 영양과 관련하여 다수 보고된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 주요 사이토카인으로, 특히 여러 종류의 알러지 반응과 자가면역 질환의 발병과 진행에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(25,26). IL-1은 IL-1 α , IL-1 β 의 형태를 가지며, 주로 대식세포에서 합성되어 T세포에 대하여 lymphokine의 생산을 촉진시키고 B세포의 성장과 분화를 자극하며 항체의 생산을 증가시키는 역할을 하고 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다(27). IL-6은 항암효과와 간세포의 단백질 합성을 유도하고

Table 4. TNF- α production by activated peritoneal macrophages of mice orally administered with different levels of *Hizikia fusiforme* water extracts for 4 weeks¹⁾

Conc. (mg/kg b.w.)	TNF- α production (pg/mL) ²⁾	
	Without mitogen	LPS treated
0 (control)	186.67±9.60 ^b	676.57±9.35 ^b
50	175.17±5.50 ^b	708.51±7.70 ^a
500	236.49±4.52 ^a	663.16±6.02 ^b

¹⁾Macrophages were incubated with or without (control) *Hizikia fusiforme* water extracts for 48 hr. Levels of cytokine were determined by triplicates cultured supernatant cells and values are mean±SD.

²⁾Means with different letters (a-c) in a column are significantly different at $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

조직 손상에 대한 발열반응을 초래하며, IL-1과 협동적으로 작용하여 B세포에서의 면역 글로불린 유리를 촉진시키고 흉선세포와 T세포의 분화에 관여한다(28,29). TNF- α 는 주로 대식세포에서 생성되어 면역반응을 증가시키고, 혈관 성장 자극, 에너지유출 증가, 감염, 염증과 창상 치유의 촉진과 종양에 항증식작용을 한다(30).

선행연구에서 다시마 첨가 식이와 일반 섬유소(cellulose) 함유 대조식이 공급에 따른 비교 결과 다시마 섭취군에서 IL-1 β 분비가 50% 정도 높게 나타나 다시마 식이가 마우스의 복강 대식세포를 활성화시키는 것으로 나타났다(31). 또한 우황이 대식세포를 활성화시켜 TNF- α 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 우황을 10 mg/kg/day씩 단기와 장기로 나누어 매일 경구 주사한 결과 7일 투여 시 단독실험군은 TNF- α 의 유도가 낮았으나(0.01 U/mL) LPS와 interferon- γ 로 활성화시킨 대식세포의 TNF- α 분비량은 대조군(6.69 U/mL)에 비해 크게 증가하였다(32).

본 연구에서 뚝 열수 추출물을 경구투여한 마우스 복강 대식세포의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성이 LPS 자극에 의해 증가되었는데, 이는 LPS 자극으로 대식세포의 C3 수용체에 작용하여 체내를 보호하려는 기전(33)에 의한 것으로 생각된다. LPS로 자극하지 않은 경우는 대조군에 비해 낮은 생성능을 보이거나 큰 차이를 나타내지 않았으나 대내외적 자극에 의한 면역체계 활성화를 알아보기 위해 LPS를 첨가하여 뚝 추출물의 면역활성을 본 결과에서는 50 mg/kg b.w.의 농도에서 대체적으로 높은 활성을 나타냈다. 이는 뚝 추출물 섭취에 의해 면역활성을 잠재적으로 가지고 있다가 항원(외부물질) 침입 시 뚝 추출물이 면역세포의 활성화에 작용하여 면역기능에 영향을 미치는 것으로 사료된다. Lee(23)의 연구에서 보면 뚝으로부터 분리한 대식세포 활성화 물질에 관한 연구에 의하면 해조류 7종(뚝, 모자반, 다시마, 미역, 돌김, 곰피, 파래)에 대한 대식세포 활성능을 검색한 결과 뚝 열수 추출물 100 μ g/mL의 농도에서 180%로 가장 높은 활성을 보였고 이러한 활성을 나타내는 열수 추출물의 활성 본체는 다당이라 하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 뚝 열수 추출물의 다당류 성분이 대식세포를 활성화시켜 사이토카인 분비능에 영향을 주는 것으로 사료된다.

본 연구에서 투여된 농도를 검색하기 위하여 예비실험과 *in vitro* 연구를 진행해 가장 효과적인 두 농도를 선택하여 본 연구보다 짧은 2주 동안 50과 500 mg/kg b.w.의 두 가지 농도를 투여하여 농도 검색의 타당성에 대한 경향을 관찰하였다(20). 본 연구에서 투여된 두 농도 모두 각각 특정 면역 지표에 대한 효능이 관찰되었으며, 특히 낮은 농도인 50 mg/kg b.w.를 투여했을 때에도 사이토카인 분비능, 비장세포 증식능 등의 면역 지표가 활성화되는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 50 mg/kg b.w.의 뚝 추출물을 60 kg 성인을 기준으로 환산한다면 격일로 3,000 mg의 뚝 추출물을 섭취하는 것으로 계산할 수 있다. 따라서 일 단위

로 계산하여 1,500 mg/일의 톳 추출물에 해당하는 양으로 본 연구를 진행한 것으로 볼 수 있다. 향후 본 연구에서 검색된 톳의 면역능 증진 효과를 재검증하기 위해 보다 다양한 농도를 투여한 동물 실험과 독성 유무를 판정하기 위해 고용량에 대한 연구가 병행되어야 할 것이다. 또한 인체 적용 시험 준비 단계로 50 mg/kg b.w. 농도보다 더 낮은 농도를 투여했을 시 보이는 면역능 증진 효과에 대한 연구 또한 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 천연자원 식용 해조류인 톳으로부터 톳의 면역 증강효과를 알아보려고 마우스를 이용한 생체 내(*in vivo*) 실험 연구를 수행하였다. 톳 열수 추출물을 4주간 격일로 0, 50, 500 mg/kg b.w.의 농도로 마우스에 경구투여한 후 비장세포 증식능과 복강 대식세포에서 분비하는 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비량에 미치는 영향을 검색한 결과 두 농도 모두 Con A나 LPS로 자극 시 대조군에 비해 높은 비장세포 증식능을 보였고, 특히 50 mg/kg b.w. 농도로 투여한 군에서 비장세포 증식능이 최대를 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한 복강 대식세포에 의한 사이토카인 분비량을 측정된 결과 LPS 첨가 시 IL-1 β 의 분비량은 500 mg/kg b.w.의 농도군에서 가장 높은 생성량이 관찰되었다. 이는 LPS를 투여한 군과 투여하지 않은 군에서 모두 동일한 경향을 보였다. IL-6 분비량은 LPS 첨가 시 50 mg/kg b.w.의 농도 투여군에서 가장 높은 생성을 나타냈다. TNF- α 의 경우는 50 mg/kg b.w.의 농도로 투여한 군에서 대조군보다 유의적으로 높은 수준의 TNF- α 가 분비되었다. 이상의 본 연구에서는 50 mg/kg b.w. 톳 열수 추출물 투여군에서 비장세포 증식능과 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비량을 상승시키는 것을 알 수 있었다. 이처럼 톳 열수 추출물은 마우스 면역계의 조절기전에 작용하여 면역세포 활성을 직접적으로 촉진시키거나 또는 이와 관련된 다른 면역반응에 영향을 미침으로써 면역활성에 효과적으로 작용할 수 있으리라 사료된다. 앞으로 인체에 대한 유용한 검색이 중요한 의의가 있다고 생각되며, 톳에 존재하는 면역활성물질의 순수 분리 및 동정이 계속적으로 이루어져야 할 필요가 있고 작용 기전과 이용에 대한 상세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Kim JG, Noh Y, Park KH, Lee JS, Kim HJ, Kim MJ, Yoon MH, Kim JS, Heu MS. 2012. Preparation of natural seasoning using enzymatic hydrolysates from byproducts of Alaska pollock *Theragra chalcogramma* and sea tangle *Laminaria japonica*. *Kor J Fish Aquat Sci* 45: 545-552.
- Kim ET, Oh JH. 2009. Effect of glutathione with sea tangle extract on prevention of selenite-induced cataract formation in rats. *J Korean Ophthalmol Soc* 50: 1555-1562.
- Mo SJ, Hong HW, Bang J, Cho KW. 2011. Optimal condition for eicosapentaenoic acid production and purification from psychrophilic marine bacterium *Shewanella* sp. L93. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39: 218-223.
- Kim MC, Kim JS, Harikrishnan R, Han YJ, Heo MS. 2010. Identification and antioxidant activity using electron spin resonance spectrometry of antioxidant producing marine actinomycetes *Streptomyces* sp. ACT-18. *Kor J Microbiol Biotechnol* 38: 24-31.
- Itoh H, Noda H, Amano H, Zhuang C, Mizuno T, Ito H. 1993. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. *Anticancer Res* 13: 2045-2052.
- Kavita K, Singh VK, Jha B. 2013. 24-Branched Δ^5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Microbiol Res* doi: 10.1016/j.micres.2013.07.002.
- Motshakeri M, Ebrahimi M, Goh YM, Matanjun P, Mohamed S. 2013. *Sargassum polycystum* reduces hyperglycaemia, dyslipidaemia and oxidative stress via increasing insulin sensitivity in a rat model of type 2 diabetes. *J Sci Food Agric* 93: 1772-1778.
- Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A, Rupérez P. 2012. Effect of the red seaweed *Mastocarpus stellatus* intake on lipid metabolism and antioxidant status in healthy Wistar rats. *Food Chem* 135: 806-811.
- Dobashi K, Nishino T, Fujihara M, Nagumo T. 1989. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr Res* 194: 315-320.
- Ryu HS, Kim HS. 2006. Effect of *Zingiber officinale* and *Hizikia fusiforme* water extracts on NO production in macrophage of mice. *Korean J Food & Nutr* 19: 327-331.
- Jang SE, Chyun JH. 2007. Effects of dietary calcium level and *Hizikia fusiforme* supplementation on bone indices and serum lipid levels in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 40: 419-427.
- Song HS, Eom SH, Kang YM, Choi JD, Kim YM. 2011. Enhancement of the antioxidant and anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiforme* water extract by lactic acid bacteria fermentation. *Kor J Fish Aquat Sci* 44: 111-117.
- Lee SJ, Yim MJ, Kim GW, Cho SY, Choi JW. 2011. Anti-hyperlipidemia and antiarteriosclerosis of *Hizikia fusiformis* in Sprague-Dawley rats. *Kor J Fish Aquat Sci* 44: 443-450.
- Ryu J, Hwang HJ, Kim IH, Nam TJ. 2012. Mechanism of inhibition of HepG2 cell proliferation by a glycoprotein from *Hizikia fusiformis*. *Kor J Fish Aquat Sci* 45: 553-560.
- Kang CH, Kang SH, Boo SH, Park SY, Choi YH, Moon DO, Kim GY. 2011. Ethyl alcohol extract of *Hizikia fusiforme* induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia U937 cells by generation of reactive oxygen species. *Trop J Pharm Res* 10: 739-746.
- Kim SO, Choi YH. 2010. The ethyl alcohol extract of *Hizikia fusiforme* inhibits matrix metalloproteinase activity and regulates tight junction related protein expression in Hep3B human hepatocarcinoma cells. *J Med Food* 13: 31-38.
- Kim TY, Jin CY, Kim GY, Choi IW, Jeong YK, Nam TJ, Kim SK, Choi YH. 2009. Ethyl alcohol extracts of *Hizikia fusiforme* sensitize AGS human gastric adenocarcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis. *J Med Food* 12: 782-787.
- Kim MJ, Lee HH, Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim KS, Kim GY, Joo WH, Choi YH, Cho YS, Jeong YK. 2012. Identification of 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone

- from *Hizikia fusiforme* involved in the induction of the apoptosis mediators in human AGS carcinoma cells. *J Microbiol Biotechnol* 22: 1665-1672.
19. Kang CH, Kim MJ, Seo MJ, Choi YH, Jo WS, Lee KT, Jeong YK, Kim GY. 2013. 5-Hydroxy-3,6,7,8,3'4'-hexamethoxyflavone inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia via NF- κ B suppression and Nrf-2-dependent heme oxygenase-1 induction. *Food Chem Toxicol* 57: 119-125.
 20. Ryu HS, Jung YH, Kim HS. 2007. Effects of *Hizikia fusiforme* water extracts on mouse immune cell activation. *Korean J Nutr* 40: 624-629.
 21. Lee YS, Kim DS, Ryu BH, Lee SH. 1992. Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 544-550.
 22. Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull Korea Fish Soc* 23: 345-352.
 23. Lee HY. 1998. Macrophage activating polysaccharides from *Hizikia fusiforme*. *MS Thesis*. Korea University, Seoul, Korea. p 30-31.
 24. Lee JH, Shin SJ, Moon Y. 1998. Effect of *Scutellaria baicalensis* extract on the immune functions, microbial growth and mutagenicity. *Korean J Immunol* 20: 343-348.
 25. Miossec P. 1997. Cytokine-induced autoimmune disorders. *Drug Saf* 17: 93-104.
 26. Meydani SN. 1990. Dietary modulation of cytokine production and biologic functions. *Nutr Rev* 48: 361-369.
 27. Arend WP, Dayer JM. 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 151-160.
 28. Liu M, Li J, Kong F, Lin J, Gao Y. 1998. Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology* 40: 187-198.
 29. Dinarello CA, Endres S, Meydani SN, Meydani M, Hellerstein MK. 1990. Interleukin-1, anorexia, and dietary fatty acids. *Ann N Y Acad Sci* 587: 332-338.
 30. Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA Jr, Goeddel DV. 1985. Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol* 135: 2492-2497.
 31. Cho SH, Yang KM, Bae B, Im S, Yu R. 1998. Effect of sea tangle intake on cytokine production in macrophage from normal and diabetic mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 952-959.
 32. Son EW, Park JH, Kim KR, Kim BO, Rhee DK, Pyo S. 1998. Effects of the administration of Bezoar Bovis on immune responses of mice. *Kor J Pharmacogn* 29: 48-55.
 33. Yee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.