

연구노트

## 참치 추출물의 일산화질소 및 사이토카인 생성에 미치는 영향

김광혁 · 최명원 · 최향미<sup>1</sup> · 임선영<sup>1\*</sup>

고신대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>1</sup>한국해양대학교 해양환경생명과학부

### Effect of Tuna Extracts on Production of Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines

Kwang-Hyuk Kim, Myoung Won Choi, Hyang Mi Choi<sup>1</sup>, and Sun-Young Lim<sup>1\*</sup>

Department Microbiology, Kosin University College of Medicine

<sup>1</sup>Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University

**Abstract** The effect of tuna extracts on the production of nitric oxide (NO) and cytokines including interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), was investigated. All extracts and fractions from tuna significantly reduced NO production induced by lipopolysaccharide (LPS). The acetone+methylene chloride (A+M) extract, *n*-hexane and 85% aqueous methanol (MeOH) fractions had stronger inhibitory effects among them. The 85% aqueous MeOH fraction at a 10- $\mu$ g concentration significantly decreased LPS-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  productions at 6 h of incubation. In the case of LPS-induced IFN- $\gamma$  production, the 85% aqueous MeOH fraction at a 3- $\mu$ g concentration showed significantly higher levels at 48 h of incubation. These results show that the 85% aqueous MeOH fraction inhibited the production of NO and pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ ), suggesting that this fraction acts as a potent immunomodulator.

**Keywords:** tuna extract, nitric oxide, interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$

## 서 론

사이토카인은 면역세포에서 생성되는 단백질 중재자로 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요하다. 현재 12가지 이상의 사이토카인들이 규명되었고 대부분 최근에 밝혀진 것으로 기능이 많이 알려져 있지 않으나 그 중에서 interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 등을 중심으로 그 기능들이 알려져 있다(1). IL-6는 골수에서 megakaryocyte를 성숙시키며 B 세포의 분화를 유도하는 B 세포 성장인자로 IL-1과 협동적으로 작용하고(2) IFN- $\gamma$ 는 내재면역반응에 관여하는 대식세포를 활성화시키는 중요한 역할을 하는 사이토카인이다(3). TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 합성되는 폴리펩티드로 감염, 염증에 관여하며 중앙괴사인자로 알려진 물질로 조직손상, 암세포 괴사 및 다른 사이토카인의 발현 등 주요 생리기능을 유도하는 사이토카인이다(4,5). 염증 유발에 중요한 역할을 하는 nitric oxide (NO)는 그람 음성균의 세포외막 구성성분인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 자극받은 단구 또는 대식세포에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되며 이는 면역반응, 세포 독성, 신경전달계

및 혈관이완 등 다양한 생물학적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. NO는 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다(6). 특히 NO 합성경로 중 inducible NOS (iNOS)에 의한 NO 생성은 염증 자극에 의해 지속적으로 대량 생산이 유도됨으로써 염증반응에 기여하게 되는데 이러한 iNOS는 대식세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 와 같은 염증성 사이토카인의 자극에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다(7).

참치(*Thunnus thynnus*)는 농어목 고등어과의 바닷물고기로 지방함량이 높아지는 12-2월에 가장 맛이 좋으며 주로 회, 초밥 등으로 섭취되며 육질이 고와 최고급 어종으로 분류된다. 또한 고 단백질 식품으로 영양학적으로 우수할 뿐만 아니라 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3)와 docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3)와 같은 n-3계 다가불포화지방산을 많이 함유하고 있어 혈중 콜레스테롤 감소로 인한 동맥경화 예방(8), 뇌혈관 질환의 감소(9) 및 항암 활성(10)과 같은 여러 가지 생리 활성 작용을 가진다. 해양동물의 면역 조절능에 관한 연구로 Wu 등(11)은 해양 동물에서 EPA를 추출하여 이것을 마우스에 급여하였을 때 EPA가 IL-2를 증가시키고 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 생성을 억제한다고 보고하였으며 Mohammad 등(12)은 해양 무척추동물인 군소에서 추출한 dolestatin 10의 유도체인 auristatin PE가 만성 백혈병 치료에 도움이 된다고 보고하였다. 따라서 해양 동물 유래의 성분으로부터 다양한 생리활성이 인지되어 해양 동물 자원 소재의 개발의 필요성이 인지되고 있다. 선행된 연구(13)에서 참치를 유기용매로 추출하여 이들 참치 추출물 및 분획물들에 의한 인체 결합암 및 섬유육종 세포에 대한 증식 및 세포 내 활성산소종 억제 효과를 살펴 본 결과 참치 추출물 및 분획물들에서 85% aqueous methanol 분획물에 의한 항암 및 항산화 효과가 높았음을 확인하였다. 참치는 대표적인 등 푸른 생선으로 유용 지방산인 DHA 및 EPA를

\*Corresponding author: Sun-Young Lim, Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea  
Tel: 82-51-410-4757  
Fax: 82-51-404-4750  
E-mail: sylim@hhu.ac.kr  
Received October 13, 2012; revised April 2, 2013;  
accepted April 2, 2013

다량 함유하고 있고 이들  $n$ -3계 고도로 불포화지방산에 의한 면역기능 조절은 잘 알려져 있다. 본 연구의 목적은 참치 추출물에 의한 면역 기능 조절에 대해 검토하는 것으로 특히 참치 85% aqueous methanol 분획물을 중심으로 대식세포에서 NO 생성 및 면역과정의 생물학적 작용과 대사적 변화를 유도하는 IL-6, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  같은 사이토카인의 생성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용된 참치는 부산 자갈치 수산시장에서 구입하여 적당한 크기로 토막 내어 저온 진공 건조기를 이용하여 40°C에서 40 torr의 압력으로 30시간 건조하였다. 사이토카인 생성을 위한 실험동물은 수컷 Balb/c 마우스로서 생후 8주 내외, 체중 25 g 내외의 것을 대한바이오링크(음성군, 충청북도)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. LPS는 *Escherichia coli* (serotype O26:B6)에서 분리 정제된 제품(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였고, concanavalin A (Con-A)는 Pharmacia사(Pharmacia Fire Chemicals, Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였다. IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 를 측정하기 위한 시약은 Mouse IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ELISA kit (Biolegend, San Diego, CA, USA)을 사용하였다.

### 추출 및 분획

건조된 참치는 실험 사용 전까지 -70°C의 deep freezer (NF-400SF, NIHON FREEZER, Tokyo, Japan)에 냉동 보관하였다가 유기용매 추출을 위하여 acetone:methylene chloride를 1:1 비율로 혼합하여 시료가 충분히 잠기도록 하여 24시간 방치한 후 추출하였고 이 과정을 2회 반복하여 여액을 얻었다. 또한 acetone:methylene chloride (1:1) 혼합 용매로 추출되지 않은 성분을 methanol (MeOH)로 추출하고자 남은 잔사에 acetone:methylene chloride (1:1)과 동량의 MeOH로 위와 동일한 방법으로 2회 반복하여 여액을 얻었다. 두 용매로부터 최대로 수득한 추출물을 혼합하여 다시 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여  $n$ -hexane, 85% aqueous MeOH (85% aq. MeOH),  $n$ -butanol ( $n$ -BuOH), water 분획물을 얻었다. 실험에는 각각의 추출물들을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 세포배지로 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

### Nitric oxide (NO) 측정

RAW 264.7 세포를 96-well cell culture plate에 well 당  $2 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체한 후 준비된 시료를 1시간 동안 전처리하고, NO 생성을 유도하기 위해 LPS (1  $\mu$ g/mL=1 ppm)를 처리한 후, 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 이 후 생성된 NO의 양은 Griess 시약(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine:1% sulfanilamide =1:1)을 이용하여 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrate를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험결과에 적용하여 생성된 NO의 함량을 정량하였다(14).

### 비장세포 배양 상층액

비장세포 배양 상층액은 미리 준비된 비장세포 부유액을 10%가 되게 소 태아혈청을 가한 RPMI 1640 (Gibco, Buffalo, NY,

USA) 배지로  $2 \times 10^6$  /mL 세포가 되도록 조절하여, 24 wells tissue culture plate (Costar, Corning, NY, USA)에 1 mL씩 분주한 후 자극제(LPS 2  $\mu$ g나 Con A 2  $\mu$ g)와 참치의 85% aqueous methanol fraction을 농도별(1, 3, 10  $\mu$ g/mL)로 작용시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 대조군은 0.01% DMSO가 되도록 사용하였으며 배양시간은 상기의 조건에 6, 24, 48, 72시간으로 하였다. 배양이 끝난 후 전량 배양액을 수거한 다음 300 $\times$ g에서 10분간, 10,000 $\times$ g에서 30분간 원침 시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70°C에 보관하였다(15).

### IL-6, TNF- $\alpha$ 및 IFN- $\gamma$ 측정

미리 96 wells microplate에 mouse IL-6, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 에 대한 capture 항체를 coating buffer에 희석하여 100  $\mu$ L 씩을 분주한 후 4에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 plate를 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 assay diluent 200  $\mu$ L을 분주한 후 실온에서 1 시간동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 plate의 각 well에 시료 100  $\mu$ L을 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 detection 항체 100  $\mu$ L을 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 avidin-horseradish peroxidase액 100  $\mu$ L을 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 100  $\mu$ L을 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액 100  $\mu$ L씩을 가하여 반응을 정지시켰다. Optical density는 microplate reader (Bio-Rad, Model 550, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다(16).

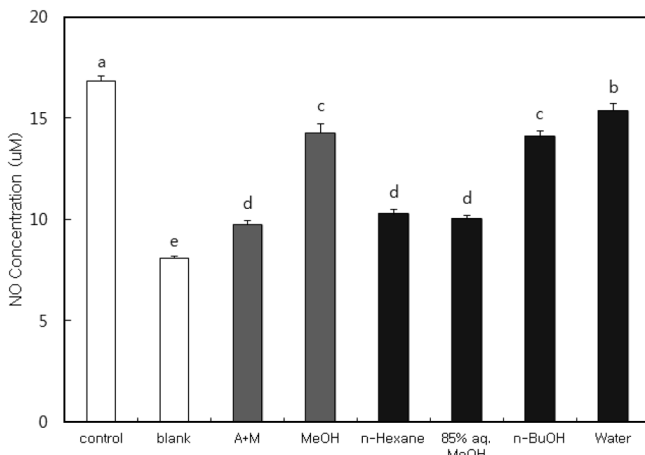
### 통계분석

실험결과는 Mean $\pm$ SD (Standard deviation)으로 나타내었고 분석된 실험 데이터는 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 ANOVA를 실시하여 유의성이 있을 경우에 post-hoc test로 Duncan's multiple range test를 실시하여 95% 수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 참치 추출물 및 분획물의 NO 생성에 미치는 효과

NO의 생성량은 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 LPS 자극으로 유도된 NO의 함량을 측정하는 것으로 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도에서 참치 추출물 및 분획물을 처리하여 배양한 후, 세포 배양액에 Griess 시약을 반응시켜 확인하였다. 시료는 0.05 mg/mL의 농도로 처리하였으며, 대조군으로는 시료대신 PBS를 사용하여 LPS를 처리 한 control과 시료 및 LPS를 처리하지 않은 blank를 사용하였다. LPS를 처리한 control은 NO의 생성량이 높게 나타났으며, LPS를 처리하지 않은 blank는 NO의 생성량이 상대적으로 매우 낮게 나타났다. 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 참치 추출물 및 분획물들의 억제효과를 확인한 결과, acetone:methylene chloride (A+M) 및 methanol (MeOH) 추출물 및 모든 분획물들은 NO 생성을 유의적으로 억제하였으며( $p < 0.05$ ), MeOH 추출물과 비교했을 때 A+M 추출물에 의한 NO 생성 저해효과가 높았다(Fig. 1). 또한 각 분획물들도 control보다 낮은 NO 생성량을 나타내었으며, 특히 85% aq. MeOH 및  $n$ -hexane 분획물에 의한 저해효과가 높았다. Calder (17)은 참치와 같은 등푸른 생선에 다량 함유된 EPA와 DHA는 이들 다가불포화지방산(PUFA)에 의해 합성된 eicosanoids에 의해 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다. 특히



**Fig. 1. Effect of extracts and fractions (0.05 mg/mL) from tuna on the production of nitric oxide.** The values were expressed as the mean±SD, and different superscripts indicate significant differences among treatments ( $p<0.05$ ). Control, sample was treated with LPS and phosphate buffered saline; Blank, sample was treated with phosphate buffered saline. A+M, acetone with methylene chloride extract; MeOH, methanol extract; *n*-Hexane, *n*-hexane fraction; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction; *n*-BuOH, *n*-butanol fraction; Water, water fraction

DHA는 LPS로 유도된 nuclear factor kappa B 활성을 저해함으로써 pro-inflammatory 사이토카인들의 생성을 저해하는 것으로 보고되었다(18).

**참치 분획물의 사이토카인 생성에 미치는 효과**

비장세포의 증식반응이 일어나면 증식하는 세포는 여러 종류의 면역반응을 매개하는 여러 가지 사이토카인을 분비한다. 선행된 항암 및 항산화 실험(13)에서 참치 분획물들 중 85% aq. MeOH 분획물에 의한 효과가 가장 높았고 NO 생성 억제능 또

한 높았다. 따라서 참치 85% aq. MeOH 분획물에 의한 비장세포의 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) 생성에 미치는 영향을 6, 24, 48, 72시간 배양한 후 살펴보았다. 본 실험에서는 두 가지 자극제를 사용하였는데 이 중 Con-A는 작두콩에서 분리된 렉틴으로 동물의 적혈구를 응집하는 작용뿐만 아니라 T림프구를 자극하는 역할을 하며, 또 다른 자극제인 LPS는 그람음성균의 외막에 존재하고 주성분은 lipid A 부분과 core 다당체 부분 등으로 되어 있다. 체내에 LPS가 들어오면 혈압을 저하시키고 쇼크를 일으키나 LPS에 의해 대식세포가 IL-1과 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 하거나, B 림프구를 형질세포로 분화시키는 역할을 한다. Table 1은 IL-6의 생성량을 나타낸 것으로 비장세포를 활성화시키는 LPS에 의해 많은 양이 분비되며 배양 시간이 증가할수록 생성량도 증가하였다. 참치 85% aq. MeOH 분획물을 농도별(1, 3 및 10  $\mu$ g/mL)로 처리했을 때 농도가 증가할수록 IL-6의 생성량은 감소하였다. 또한 반응시간별로 살펴보면 참치 85% aq. MeOH 분획물 첨가 후 배양시간이 길어질수록 IL-6의 생성량이 증가하였고 10  $\mu$ g/mL 첨가농도의 경우 6시간 배양 후 가장 낮은 IL-6 생성량을 확인할 수가 있었다( $p<0.05$ ). 이상의 결과는 참치 85% aq. MeOH 분획물에 의한 IL-6 생성의 감소 효과는 6시간 배양 후 가장 효과적이며 이후 배양시간에는 그 효과가 감소하고 72시간 배양조건에서는 효과가 없는 것으로 설명할 수 있다. 한편, 참치 85% aq. MeOH 분획물 1 및 10  $\mu$ g/mL 첨가농도에서는 농도 의존적으로 IL-6 생성을 감소시켰으나 첨가농도 3  $\mu$ g/mL의 경우 24시간 배양시간부터는 IL-6의 생성량이 급격히 증가하였다. 이러한 경향은 첨가농도 3  $\mu$ g/mL의 참치 85% aq. MeOH 분획물은 6시간 배양조건에서 가장 효과적으로 IL-6 생성을 감소시키는 것으로 여겨진다. 또 다른 자극제인 Con-A를 사용했을 때 (Table 2) 배양시간 증가와 더불어 IL-6 생성량이 증가하였다. Con-A와 함께 참치 85% aq. MeOH 분획물을 처리했을 때 IL-6의 생성량은 모든 첨가농도에서 Con-A만 처리했을 경우보다 증가하였으나 첨가농도별로 살펴보면 참치 85% aq. MeOH 분획물 첨가농도가 높을수록 IL-6의 생성량이 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결

**Table 1. Effect of 85% aqueous methanol fraction from tuna on the production of LPS induced interleukin-6 at different times in mouse spleen cells**

Samples ( $\mu$ g/mL)	Concentrations (pg/mL)			
	6 h	24 h	48 h	72 h
LPS	39.8±4.0 <sup>a</sup>	126.4±14.1 <sup>b</sup>	154.8± 2.0 <sup>ab</sup>	237.8±76.3
LPS+TM 1	19.9±4.0 <sup>b</sup>	85.2± 0.0 <sup>c</sup>	147.7±16.1 <sup>ab</sup>	215.9± 8.0
LPS+TM 3	17.1±0.0 <sup>b</sup>	164.8±32.1 <sup>a</sup>	184.7±36.2 <sup>a</sup>	193.2±40.2
LPS+TM 10	2.8±4.0 <sup>c</sup>	85.2± 0.0 <sup>c</sup>	139.2± 4.0 <sup>b</sup>	198.9±16.1

The values were expressed as the mean±SD, and different superscripts in a column indicate significant differences among treatments ( $p<0.05$ ). LPS, lipopolysaccharide; TM, 85% aqueous methanol fraction from tuna

**Table 2. Effect of 85% aqueous methanol fraction from tuna on the production of Con-A induced interleukin-6 at different times in mouse spleen cells**

Samples ( $\mu$ g/mL)	Concentrations (pg/mL)			
	6 h	24 h	48 h	72 h
Con-A	0.0±0.0	108.0±40.2	190.34±4.0 <sup>c</sup>	292.6±52.2
Con-A+TM 1	0.0±0.0	119.3±0.0	394.9±33.3 <sup>a</sup>	416.7±2.6
Con-A+TM 3	0.0±0.0	152.2±5.1	358.7±17.9 <sup>b</sup>	420.3±35.9
Con-A+TM 10	10.9±7.7	108.7±10.3	326.1±5.1 <sup>b</sup>	373.2±17.9

The values were expressed as the mean±SD, and different superscripts in a column indicate significant differences among treatments ( $p<0.05$ ). Con-A, concanavalin A; TM, 85% aqueous methanol fraction from tuna

**Table 3. Effect of 85% aqueous methanol fraction from tuna on the production of LPS induced tumor necrosis factor- $\alpha$  at different times in mouse spleen cells**

Samples ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentrations (pg/mL)			
	6 h	24 h	48 h	72 h
LPS	211.2 $\pm$ 10.3 <sup>a</sup>	228.2 $\pm$ 48.1 <sup>a</sup>	242.7 $\pm$ 41.2 <sup>a</sup>	199.5 $\pm$ 16.2
LPS+TM 1	107.8 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>	137.6 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	208.7 $\pm$ 16.2 <sup>a</sup>	181.2 $\pm$ 9.7
LPS+TM 3	144.5 $\pm$ 42.2 <sup>b</sup>	153.7 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	144.5 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	174.3 $\pm$ 19.5
LPS+TM 10	75.7 $\pm$ 9.7 <sup>c</sup>	78.0 $\pm$ 38.9 <sup>c</sup>	181.2 $\pm$ 22.7 <sup>b</sup>	206.4 $\pm$ 38.9

The values were expressed as the mean $\pm$ SD, and different superscripts in a column indicate significant differences among treatments ( $p < 0.05$ ). LPS, lipopolysaccharide; TM, 85% aqueous methanol fraction from tuna

**Table 4. Effect of 85% aqueous methanol fraction from tuna on the production of Con-A induced tumor necrosis factor- $\alpha$  at different times in mouse spleen cells**

Samples ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentrations (pg/mL)			
	6 h	24 h	48 h	72 h
Con-A	32.1 $\pm$ 6.5 <sup>c</sup>	114.7 $\pm$ 13.0 <sup>b</sup>	174.3 $\pm$ 19.5 <sup>bc</sup>	181.2 $\pm$ 16.2
Con-A+TM 1	43.6 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>	126.2 $\pm$ 35.7 <sup>b</sup>	247.5 $\pm$ 7.0 <sup>ab</sup>	252.5 $\pm$ 7.0
Con-A+TM 3	52.0 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>	138.6 $\pm$ 7.0 <sup>b</sup>	212.9 $\pm$ 14.0 <sup>b</sup>	222.8 $\pm$ 21.0
Con-A+TM 10	66.8 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	170.8 $\pm$ 17.5 <sup>a</sup>	240.1 $\pm$ 3.5 <sup>ab</sup>	225.3 $\pm$ 24.5

The values were expressed as the mean $\pm$ SD, and different superscripts in a column indicate significant differences among treatments ( $p < 0.05$ ). Con-A, concanavalin A; TM, 85% aqueous methanol fraction from tuna

과로부터 참치 85% aq. MeOH 분획물은 마우스 비장세포에서 Con-A보다 LPS에 의해 자극된 IL-6 생성을 감소시키는데 더 효과적인 것으로 여겨진다. TNF- $\alpha$ 의 경우(Table 3, 4), IL-6과 유사한 경향을 나타내어 참치 85% aq. MeOH 분획물 10  $\mu\text{g/mL}$  첨가 농도에서 6시간 배양 후 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ 의 생성량이 유의적으로 감소되었다(Table 3,  $p < 0.05$ ). 참치 85% aq. MeOH 분획물을 농도별(1, 3 및 10  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리했을 때 농도가 증가할수록 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ 의 생성량은 감소하였다. 반응시간별로 살펴보면 참치 85% aq. MeOH 분획물 첨가 후 배양시간이 길어질수록 TNF- $\alpha$ 의 생성량이 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3). Table 4는 Con-A에 의해 유도된 TNF- $\alpha$ 의 생성량 변화 추이를 나타낸 것으로 배양시간이 증가할수록 TNF- $\alpha$ 의 생성량이 증가하였다. 참치 85% aq. MeOH 분획물을 농도별(1, 3 및 10  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리했을 때 농도가 증가할수록 Con-A로 유도된 TNF- $\alpha$ 의 생성량은 6, 24 및 48시간 배양조건에서는 증가하는 경향을 나타내었고 72시간 배양조건에서는 유의적 차이가 없었다. 따라서 IL-6와 유사하게 참치 85% aq. MeOH 분획물은 LPS에서 유도되는 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 감소시키는데 더 효과적인 것으로 여겨진다. Table 5와 6은 LPS와 Con-A로 각각 자극하여 IFN- $\gamma$ 의 생성 변화를 나타낸 결과로 LPS와 Con-A에 의해 배양시간과 더불어 IFN- $\gamma$ 의 생성량이 증가함을 확인할 수가 있었다. 참치 85% aq. MeOH 분획물 농도별로 살펴보면 농도가 증가할수록 IFN- $\gamma$ 의 생성을 감소시키는 경향을 나타내었다. 배양조건별로 살펴보면 참치 85% aq. MeOH 분획물(1 및 3  $\mu\text{g/mL}$  첨가농도)을 LPS와 함께 처리 했을 때 24시간과 48시간 배양했을 때 IFN- $\gamma$ 의 생성량이 증가하는 경향이었으나 유의적 차이는 없었고 72시간 배양 시 1 및 3  $\mu\text{g/mL}$  첨가농도의 경우 IFN- $\gamma$ 의 생성량이 감소하였으나 첨가농도 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 경우 배양시간이 길어질수록 IFN- $\gamma$ 의 생성량이 증가하는 경향을 나타내었다(Table 5). Con-A의 경우 참치 85% aq. MeOH 분획물과 함께 처리했을 때 모든 농도에서 Con-A만 처리한 대조군과 비교했을 때 생성량이 감소되는 것을 확인하였다(Table 6). 참치 85% aq. MeOH 분획물을 1 및

10  $\mu\text{g/mL}$  첨가했을 때 배양시간 증가할수록 IFN- $\gamma$ 의 생성량이 증가하다가 72시간 배양조건에서 다시 감소하는 경향을 나타내었으나 첨가농도 3  $\mu\text{g/mL}$ 의 경우 IFN- $\gamma$ 의 생성량이 배양시간과 함께 증가하였다. 따라서 참치 85% aq. MeOH 분획물은 모든 첨가농도에서 24시간 배양조건의 경우 가장 효과적으로 IFN- $\gamma$ 의 생성을 감소시키는 것으로 여겨진다.

Hwang 등(19)은 참치 에탄올 추출물에 의한 항암활성 및 면역학적 실험을 한 결과 *in vitro* 인체 장암세포 및 백혈병성 임파모 세포의 증식을 억제하였으며 S-180 세포를 접종한 후 참치 추출물을 투여한 생쥐에서 용혈반 형성 세포수와 혈청 단백질 중 immunoglobulin의 상대적 비율이 현저히 증가함을 관찰하여 생체 내에서 면역 증강 효과를 나타내는 성분이 존재함을 보고하였다. Park 등(20)은 해양 동물 중의 하나인 군소(*Aplysia kurodai*)에서 추출한 다당 분획물의 면역조절 효과를 검토한 결과 T cell line의 증식에 대하여 농도가 증가함에 따라 증식능이 증가하는 효과를 보여주었고 T-cell에서 24시간과 48시간 동안 군소 다당 분획물을 처리하였을 때 IL-2와 IFN- $\gamma$  생성량의 유의적 증가는 없었으나 RAW 264.7 cell line에 대하여 IL-12의 경우 47% 이상 증가하였다고 보고하였다. 참치기름은 약 30% 이상의 DHA와 약 6%의 EPA를 함유하고 있는데 인체연구에 의하면 이들 n-3계 고도불포화지방산들이 IL-1, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 pro-inflammatory 사이토카인의 생성을 억제한다고 보고되었다(21,22). Weldon 등(23)은 EPA와 DHA 투여는 염증을 유발하는 유전자 발현 및 pro-inflammatory 사이토카인의 생성을 억제하였다고 보고하였고 DHA에 의한 저해효과가 더 우수하였다고 보고하였다. LeBlanc 등(24)은 개를 이용한 동물실험에서 생선기름 투여는 혈청 prostaglandin E2 (PGE2) 농도와 IL-1 및 IL-6의 활성을 감소시켜 항염증 효과를 나타내었다고 보고하였다. 따라서 참치 85% aq. MeOH 분획물은 NO 생성과 IL-6와 TNF- $\alpha$  같은 pro-inflammatory 사이토카인을 감소시켜 염증반응을 예방할 것으로 기대되며 향후 참치 85% aq. MeOH 분획물을 더욱 정제하여 면역조절 물질의 구조를 동정할 필요가 있다.

**Table 5. Effect of 85% aqueous methanol fraction from tuna on the production of LPS induced interferon- $\gamma$  at different times in mouse spleen cells**

Samples ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentration ( $\text{pg/mL}$ )			
	6 h	24 h	48 h	72 h
LPS	0.0 $\pm$ 0.0	1055.6 $\pm$ 157.2 <sup>a</sup>	1027.8 $\pm$ 39.3	2833.3 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
LPS+TM 1	0.0 $\pm$ 0.0	1291.7 $\pm$ 58.9 <sup>a</sup>	1583.3 $\pm$ 117.9	1250.0 $\pm$ 117.9 <sup>bc</sup>
LPS+TM 3	0.0 $\pm$ 0.0	1208.3 $\pm$ 58.9 <sup>a</sup>	1875.0 $\pm$ 176.8	1458.3 $\pm$ 176.8 <sup>b</sup>
LPS+TM 10	0.0 $\pm$ 0.0	541.7 $\pm$ 58.9 <sup>b</sup>	833.3 $\pm$ 235.7	1000.0 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>

The values were expressed as the mean $\pm$ SD, and different superscripts in a column indicate significant differences among treatments ( $p < 0.05$ ). LPS, lipopolysaccharide; TM, 85% aqueous methanol fraction from tuna

**Table 6. Effect of 85% aqueous methanol fraction from tuna on the production of Con-A induced interferon- $\gamma$  at different times in mouse spleen cells**

Samples ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentration ( $\text{pg/mL}$ )			
	6 h	24 h	48 h	72 h
Con-A	125.0 $\pm$ 59.0	2000.0 $\pm$ 235.7 <sup>a</sup>	3916.7 $\pm$ 707.1	4333.3 $\pm$ 942.8 <sup>a</sup>
Con-A+TM 1	0.0 $\pm$ 0.0	1416.7 $\pm$ 353.6 <sup>b</sup>	2225.0 $\pm$ 1025.3	1650.0 $\pm$ 282.8 <sup>b</sup>
Con-A+TM 3	0.0 $\pm$ 0.0	1791.7 $\pm$ 294.6 <sup>b</sup>	1850.0 $\pm$ 212.1	2200.0 $\pm$ 70.7 <sup>b</sup>
Con-A+TM 10	0.0 $\pm$ 0.0	1333.3 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1575.0 $\pm$ 176.8	1375.0 $\pm$ 35.4 <sup>b</sup>

The values were expressed as the mean $\pm$ SD, and different superscripts in a column indicate significant differences among treatments ( $p < 0.05$ ). Con-A, concanavalin A; TM, 85% aqueous methanol fraction from tuna

## 요약

본 연구에서는 참치 추출물 및 분획물들에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 살펴보고 참치 85% aq. MeOH 분획물을 중심으로 면역과정의 생물학적 작용과 대사적 변화를 유도하는 IL-6, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  같은 사이토카인의 생성을 측정하여 참치 추출물에 의한 면역 기능 조절에 대하여 검토하였다. 참치 추출물과 각 분획물들은 control보다 낮은 NO 생성량을 나타내었으며, 특히 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane 분획물에 의한 저해효과가 높았다. IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 경우, 참치 85% aq. MeOH 분획물을 농도별(1, 3 및 10  $\mu\text{g}$ )로 처리했을 때 그 중 10  $\mu\text{g/mL}$  첨가농도에서 6시간 배양 후 가장 낮은 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성량을 확인할 수가 있었다( $p < 0.05$ ). IFN- $\gamma$ 의 생성은 참치 85% aq. MeOH 분획물(1, 3  $\mu\text{g/mL}$  첨가농도)을 LPS와 함께 처리 했을 때 24시간과 48시간 배양 시 생성량이 증가하는 경향이었으나 유의적 차이는 없었다. 따라서 참치 85% aq. MeOH 분획물은 NO 생성과 pro-inflammatory 사이토카인(IL-6와 TNF- $\alpha$ )을 감소시켜 염증반응을 예방할 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 과제(결과물)은 해양수산부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력 양성사업의 연구결과입니다.

## References

- Meydani SN. Dietary modulation of cytokine production and biologic functions. *Nutr. Rev.* 48: 361-369 (1990)
- Miller RA. The cell biology of aging: immunological models. *J. Gerontol.* 44: B4-B8 (1989)
- Hayward AR, Chmura K, Cosyns M. Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J. Infect. Dis.* 182: 1001-1004 (2000)
- Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate *in vivo*. *J. Immunol.* 135: 3972-3977 (1985)

- Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *New Engl. J. Med.* 316: 379-385 (1987)
- Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705-707 (1992)
- Oshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* 305: 253-264 (1994)
- Saito H, Saito I, Chang KJ, Tamura Y, Yoshida S. Effect of ingestion of eicosapentaenoic acid ethylester on the scavenger activity for acetylated LDL and the production of platelet-derived growth factor in rat peritoneal macrophages. *Adv. Prostag. Thromb. L.* 21A: 241-244 (1991)
- Zhang J, Sasaki S, Amano K, Kesteloot H. Fish consumption and mortality from all causes, ischemic heart disease, and stroke: an ecological study. *Prev. Med.* 28: 520-529 (1999)
- Takahashi M, Minamoto T, Yamashita N, Yazawa K, Sugimura T, Esumi H. Reduction in formation and growth of 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci in rat colon by docosahexaenoic acid. *Cancer Res.* 53: 2786-2789 (1993)
- Wu D, Meydani SN, Meydani M, Hayek MG, Huth P, Nicolosi RJ. Immunologic effects of marine- and plant-derived n-3 polyunsaturated fatty acids in nonhuman primates. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 273-280 (1996)
- Mohammad RM, Varterasian ML, Almachy VP, Hannoudi GN, Pettit GR, Al-Katib A. Successful treatment of human chronic lymphocytic leukemia xenografts with combination biological agents auristatin PE and bryostatin 1. *Clin. Cancer Res.* 4: 1337-1343 (1998)
- Jang JR, Kim KK, Mun SB, Lim SY. *In vitro* anticancer and antioxidant effect of solvent extracts from tuna dried at low temperature vacuum. *J. Life Sci.* 19: 633-638 (2009)
- Green LC, Wagner DA, Logowski GJ, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138 (1982)
- Hwang SA, Dasgupta A, Actor JK. Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to *Echinacea* extracts. *Clin. Chim. Acta* 343: 161-166 (2004)
- Kim KH, Kim SH, Park KY. Effects of kimchi extracts on production of nitric oxide by activated macrophages, transforming growth factor-beta 1 of tumor cells and interleukin-6 in splenocytes. *J. Food Sci. Nutr.* 6: 126-132 (2001)

17. Calder PC. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostag. Leukotr. Ess.* 79: 101-108 (2008)
18. De Smedt-Peyrusse V, Sargueil F, Moranis A, Harizi H, Mongrand S, Laye S. Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. *J. Neurochem.* 105: 296-307 (2008)
19. Hwang WI, Baik NG, Hwang YK, Lee SD. Antitumor and immunological effects of tuna extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 353-366 (1992)
20. Park S, Chung SY, Choi YJ. Immune regulating effect of polysaccharide fraction from sea hare (*Aplysia kurodai*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 372-378 (2011)
21. Bouwens M, van de Rest O, Dellsscharft N, Bromhaar MG, de Groot LC, Geleijnse JM, Muller M, Afman LA. Fish-oil supplementation induces anti-inflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 90: 415-424 (2009)
22. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 116-122 (1996)
23. Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, Hurley LA, Roche HM. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *J. Nutr. Biochem.* 18: 250-258 (2007)
24. LeBlanc CJ, Horohov DW, Bauer JE, Hosgood G, Mauldin GE. Effects of dietary supplementation with fish oil on *in vivo* production of inflammatory mediators in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res.* 69: 486-493 (2008)