

Protective Effect of Dried Mackerel Extract on Lipopolysaccharide-induced Inflammation

Kwang-Hyuk Kim¹, Myoung Won Choi¹, Hyang Mi Choi² and Sun-Young Lim^{2*}¹Department Microbiology, Kosin University College of Medicine, Busan 602-703, Korea²Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime and Ocean University, Busan 606-080, Korea

Received August 2, 2013 / Revised September 9, 2013 / Accepted September 9, 2013

The effect of dried mackerel extract on the production of nitric oxide (NO) and cytokines, including interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ), was investigated. All extracts and fractions from dried mackerel significantly reduced NO production induced by lipopolysaccharide (LPS). Among the extracts, acetone+methylene chloride (A+M), *n*-hexane, and 85% aqueous methanol (MeOH) showed the strongest inhibitory effects. The 85% aqueous MeOH fraction at a concentration of 10 μ g significantly decreased LPS-induced IL-6 and TNF- α production after 6 hr of incubation. In the case of LPS-induced IFN- γ production, the 85% aqueous MeOH fraction decreased the production of IFN- γ after 6, 24, and 72 hr of incubation in a dose-dependent manner. The results show that an 85% aqueous MeOH fraction inhibits the production of NO and proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IFN- γ), suggesting that this fraction acts as a potent immunomodulator.

Key words : Interferon- γ , interleukin-6, mackerel extract, nitric oxide, tumor necrosis factor- α

서 론

선천적 면역은 박테리아나 바이러스 감염에 대해 방어할 수 있는 다양한 작용기전을 통해 활성화되는 고전적 숙주방어 형태이다. 그러나 지속적이며 과도한 면역반응은 도리어 조직 손상을 촉진하고 그 결과 일부에서는 패혈증과 만성염증을 유발하게 된다[3]. 염증과정 중 염증유도 사이토카인 및 nitric oxide (NO)는 inducible NO synthase (iNOS)에 의해 다량 생성된다[9]. 특히 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)는 대식세포에서 생산되는 대표적인 pro-inflammatory 사이토카인으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다[8]. 내독소로 잘 알려진 LPS (lipopolysaccharide)는 그람음성균의 세포외막에 존재하여, RAW 264.7 세포와 같은 대식세포 또는 단핵세포에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine 등 염증 매개물질의 생산을 자극한다[1, 18, 25]. Con-A는 작두콩에서 분리된 렉틴으로 동물의 적혈구를 응집하는 작용뿐만 아니라 T 림프구를 자극하는 역할을 하며 IL-2와 같은 사이토카인을 생성한다[22]. 이러한 염증반응은 박테리아의 제거에 유리하게 작용하지만, 통제범위를 넘어선 과도한 염증반응은

TNF- α , IL-1 및 IL-6 등의 염증매개 사이토카인을 다량 생산하게 되고, 이러한 염증 매개물질들은 조직을 손상시킨다[20].

고등어(*Scomber japonicus*)는 농어목 고등어과에 속하는 해산어류로 n-3계열지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3)와 docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) 같은 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)을 많이 함유하고 있을 뿐만 아니라 단백질, 지방, 칼슘, 인, 나트륨, 칼륨 등의 영양소들도 함유하고 있다. 특히 어류의 근육은 EPA와 DHA 같은 n-3계열 PUFA를 많이 함유하고 있으며[24], 고등어와 같은 회유어종의 근육에서는 비회유어종보다 DHA 함량이 높게 나타난다[19, 21]. Wu [29] 등은 해양동물에서 EPA를 추출하여 마우스에 급여하였을 때 EPA가 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성을 억제한다고 보고하였다. Weldon [28] 등은 EPA와 DHA 투여는 염증을 유발하는 유전자 발현 및 pro-inflammatory 사이토카인의 생성을 억제한다고 보고하였고 DHA에 의한 저해효과가 더 우수하였다고 보고하였다. 본 연구의 목적은 건조 고등어 추출물에 의한 항염증 활성을 검증하는 것으로 특히 고등어 85% aqueous methanol 분획물을 중심으로 비장세포에서 T 세포 증식자극 물질로서의 Con와 B 세포 자극물질로서 LPS를 이용하여 NO 생성 및 면역과정의 생물학적 작용과 대사적 변화를 유도하는 IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 같은 염증유발 사이토카인의 생성을 측정하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-410-4757, Fax : +82-51-404-4750

E-mail : sylim@kmou.ac.kr

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

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용된 고등어는 부산 자갈치 수산시장에서 구입하여 적당한 크기로 토막 내어 저온진공 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. Lipopolysaccharide (LPS)는 *Escherichia coli* (serotype 026:B6)에서 분리정제된 제품(Sigma-Aldrich Corp. Saint Louis, MO, USA)과 concanavalin A (Con-A)는 Pharmacia사(Pharmacia Fire Chemicals, Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였다. IL-6, TNF- α , IFN- γ 를 측정하기 위한 시약은 Mouse IL-6, TNF- α , IFN- γ ELISA kit (Biolegend, San Diego, USA)를 사용하였다.

건조고등어로부터 유기용매를 이용한 추출물 및 분획물 제조 건조된 고등어는 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) 혼합용매로 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 최대 수득한 추출물을 혼합하여 다시 용매극성에 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(Fig. 1).

Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포를 96-well cell culture plate에 well 당 2×10^4 cells/ml가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체한 후 준비된 시료를 1시간 동안 전처리하고, nitric oxide 생성을 유도하기 위해 LPS (1 μ g/ml = 1 ppm)를 처리한 후, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 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 nitric oxide의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험결과에 적용하여 생성된 nitric oxide의 함량을 정량하였다[23].

비장세포 배양 상층액 분리 및 IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 측정

수컷 Balb/c 마우스를 희생시킨 후 비장을 분리하고, RPMI 1640 배지로 균질화한 후 상층액이 2×10^6 /ml가 되도록 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 (Gibco, Buffalo, NY, USA) 배지로 조절한다. 24 wells tissue culture plate (Costar, Corning, NY,

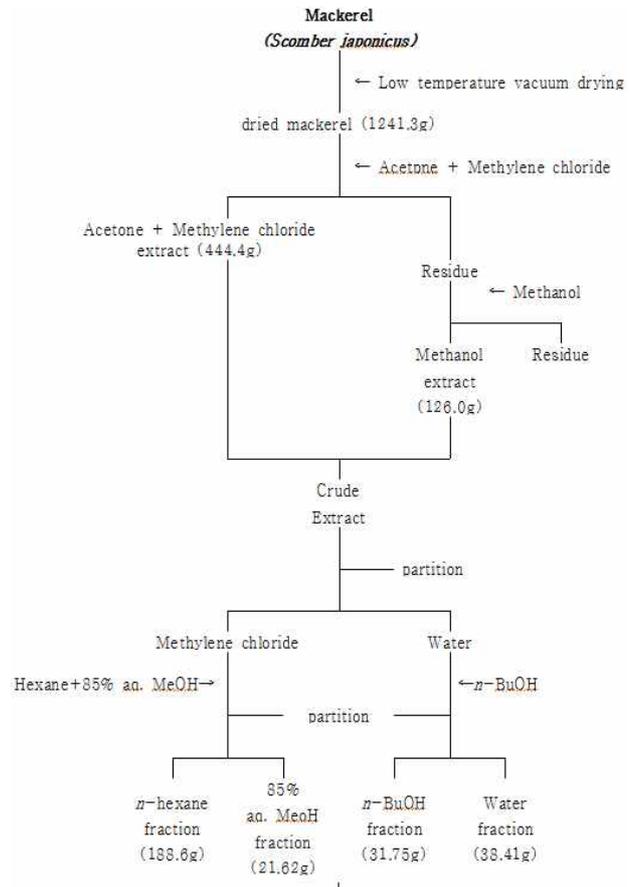


Fig. 1. The procedure for solvent extract and fraction of mackerel.

USA)에 1 ml씩 분주한 후 자극제(LPS 2 μ g나 Con-A 2 μ g)와 건조 고등어의 85% aq. MeOH 분획물을 농도별(1, 3, 10 μ g/ml)로 작용시켜 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 대조군은 0.01% DMSO가 되도록 사용하였으며 배양시간은 상기의 조건에 6, 24, 48 및 72시간으로 하였다. 배양이 끝난 후 전량 배양액을 수거한 다음 300 \times 에서 10분간, 10,000 \times 에서 30분간 원심시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70°C에 보관하였다 [10]. 미리 96 wells microplate에 mouse IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 에 대한 capture 항체를 coating buffer에 희석하여 100 μ l씩을 분주한 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 plate를 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 assay diluent 200 μ l를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 plate의 각 well에 시료 100 μ l을 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 detection 항체 100 μ l를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 avidin-horseradish peroxidase액 100 μ l를 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 100 μ l를 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액 100 μ l씩을 가하여 반응을 정지시

켰다. Optical density는 ELISA (Bio-Rad, Model 550, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다[17].

통계분석

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

결과 및 고찰

건조 고등어 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 효과

혈관내피로부터 유래된 nitric oxide는 강력한 혈관확장제로 작용함으로써 혈관 항상성을 유지시키는 반면 염증상태에서의 과도한 nitric oxide의 생성은 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 급성과 만성염증에 대한 반응으로 조직의 손상을 일으킬 수 있다[26]. Nitric oxide의 생성량은 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 LPS 자극으로 유도된 nitric oxide의 함량을 측정하는 것으로 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도에서 건조 고등어 추출물 및 분획물을 처리하여 배양한 후, 세포배양액에 Griess 시약을 반응시켜 확인하였다. 시료는 0.05 mg/ml의 농도로 처리하였으며, 대조군으로는 시료 대신 PBS를 사용하여 LPS를 처리한 control과 시료 및 LPS를 처리하지 않은 blank를 사용하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 LPS를 처리한 control은 nitric oxide의 생성량이 높게 나타났으며, LPS를 처리하지 않은 blank는 nitric oxide의 생성량이 상대적으로 매우 낮게 나타났다. 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide 생성에 대한 건조 고등어 추출물 및 분획물들의 억제효과를 확인한 결과, acetone:methylene chloride (A+M) 및 methanol (MeOH) 추출물 및 모든 분획물들은 nitric oxide 생성을 유의적으로 감소시켰으며($p < 0.05$), MeOH 추출물과 비교했을 때 A+M 추출물에 의한 nitric oxide 생성 억제효과가 높았다. 또한 각 분획물도 control보다 낮은 nitric oxide 생성량을 나타내었으며, 특히 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane 분획물에 의한 억제효과가 높았다. Calder [4]은 참치와 같은 등 푸른 생선에 다량 함유된 EPA와 DHA는 PUFA에 의해 합성된 eicosanoids에 의해 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 DHA [14]와 EPA [15]는 LPS로 유도된 nitric oxide 생성을 저해한다고 보고되었으며, 특히 DHA는 LPS로 유도된 nuclear transcription factor-kappa B (NF-κB) 활성을 저해함으로써 pro-inflammatory 사이토카인들의 생성을 저해하는 것으로 보고되었다[7]. NF-κB는 사이토카인, 성장인자 및 세포부착분자 등에 관련된 여러 유전자들의 발현에

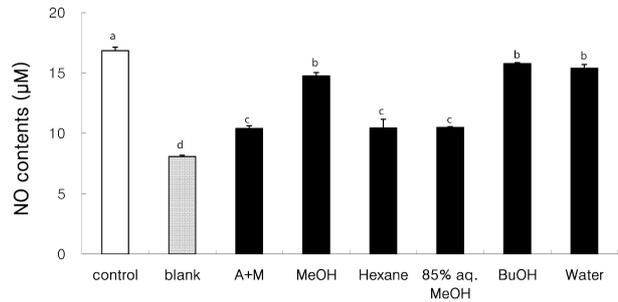


Fig. 2. Effect of extracts and fractions (0.05 mg/ml) from dried mackerel on the production of nitric oxide (NO). The values were expressed as the mean ± SD and different superscripts indicate significant differences among treatments ($p < 0.05$). Control, sample was treated with LPS and phosphate buffered saline; Blank, sample was treated with phosphate buffered saline. A+M, acetone with methylene chloride extract; MeOH, methanol extract; Hexane, *n*-hexane fraction; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction; BuOH, *n*-butanol fraction; Water, water fraction

중요한 역할을 하는 전사인자로서 활성화된 NF-κB는 iNOS, IL-6 및 TNF-α 등 여러 염증매개물질들의 전사를 촉진한다고 알려져 있다[13].

건조 고등어 추출물 및 분획물의 IL-6, TNF-α 및 IFN-γ 생성 억제 효과

비장세포의 증식반응이 일어나면 증식하는 세포는 여러 종류의 면역반응을 매개하는 여러 가지 사이토카인을 분비한다. 선행된 항암 및 항산화 실험[12]에서 건조 고등어 분획물들 중 85% aq. MeOH 분획물에 의한 효과가 가장 높았고 nitric oxide 생성 억제능 또한 높았다. 따라서 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물에 의한 비장세포의 사이토카인(IL-6, TNF-α, and IFN-γ) 생성에 미치는 영향을 6, 24, 48 및 72시간 배양한 후 살펴보았다. 본 실험에서 사용된 비장세포 자극제로는 B 세포 자극물질인 LPS와 T 세포 증식 자극 물질인 Con-A가 사용되었다. IL-6, TNF-α 같은 pro-inflammatory 사이토카인은 염증반응을 매개하는 물질로 초기염증반응에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다[27]. IL-6는 단핵세포와 대식세포에 의해 분비되는데 분화된 B 세포가 형질세포로 분화되도록 촉진시키고 항체의 분비를 자극하고 염증부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다[6]. Table 1은 IL-6의 생성량을 나타낸 것으로 비장세포를 활성화시키는 LPS 자극에 의해 IL-6는 분비되며 배양시간이 증가할수록 생성량도 증가하였다. 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물을 농도별(1, 3 및 10 µg)로 처리했을 때 농도가 증가할수록 IL-6의 생성량은 감소하였다. 또한 반응시간별로 살펴보면 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물 첨가 후 배양시간이 길어질수록 IL-6의 생성량이 증가하였고 모든 첨가농도의 경우 6시간 배양 후 가장 낮은

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

Samples (µg/ml)	Concentrations (pg/ml)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	39.8±4.0 ^a	126.4±14.1	154.8±2.0 ^a	235.8±76.3
LPS+85% aq. MeOH 1	11.4±16.1 ^b	122.2±20.1	161.9±28.1 ^a	255.7±40.2
LPS+85% aq. MeOH 3	2.8±4.0 ^b	127.8±20.1	176.1±0.0 ^a	173.3±12.1
LPS+85% aq. MeOH 10	0.0±0.0 ^b	76.7±36.2	105.1±12.1 ^b	210.2±0.0

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

IL-6 생성량을 확인할 수가 있었다($p < 0.05$). 이상의 결과는 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물에 의한 IL-6 생성의 감소효과는 6시간 배양 후 가장 효과적이며 24 및 72시간 배양조건에서는 효과가 없는 것으로 설명할 수 있다. LPS 자극 때와는 다르게 T 세포 자극물질인 Con-A에 대해서는 초기(6시간)에는 생성되지 않았으나 배양시간과 더불어 IL-6 생성량이 증가하였다(Table 2). Con-A와 함께 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물을 처리했을 때 초기에는 IL-6이 생성되지 않았으나 24시간 배양 후 모든 첨가농도에서 Con-A만 처리했을 경우보다 IL-6의 생성량이 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적 차이는 없었다. 이상의 결과로부터 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물은 마우스 비장세포에서 Con-A보다 LPS에 의해 자극된 IL-6 생성을 감소시키는데 더 효과적인 것으로 여겨진다. TNF- α 의 경우(Table 3과 4), 앞서의 IL-6과 유사한 경향을 나타내어 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물은 모든 첨가농도에

서 6시간 배양 후 LPS로 유도된 TNF- α 의 생성량을 유의적으로 감소시켰다(Table 3, $p < 0.05$). 반응시간별로 살펴보면 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물은 첨가 후 배양시간이 길어질수록 TNF- α 의 생성량이 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3). Table 4는 Con-A에 의해 유도된 TNF- α 의 생성량 변화추이를 나타낸 것으로 배양시간이 증가할수록 TNF- α 의 생성량이 증가하였다. 그러나 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물을 농도별(1, 3 및 10 µg)로 처리했을 때 Con-A만 처리한 대조군과 비교했을 때 TNF- α 의 생성량은 유의적 차이가 없었으나 24시간 배양조건에서는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 IL-6와 유사하게 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물은 LPS에서 유도되는 TNF- α 의 생성량을 감소시키는데 더 효과적인 것으로 여겨진다. Table 5와 6은 LPS와 Con-A로 각각 자극하여 IFN- γ 의 생성변화를 나타낸 결과로 LPS와 Con-A에 의해 배양시간과 더불어 IFN- γ 의 생성량이 증가함

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

Samples (µg/ml)	Concentrations (pg/ml)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con-A	0.0±0.0	108.0±40.2	190.3±4.0	292.6±52.2
Con-A +85% aq. MeOH 1	0.0±0.0	110.1±20.1	255.7±32.1	267.1±24.1
Con-A +85% aq. MeOH 3	0.0±0.0	59.7±36.2	176.1±0.0	335.2±24.1
Con-A +85% aq. MeOH 10	0.0±0.0	93.8±28.1	247.2±36.2	292.6±12.1

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; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction from dried mackerel.

Table 3. Effect of 85% aqueous methanol fraction from dried mackerel on the production of LPS induced tumor necrosis factor- α at different times in mouse spleen cells

Samples (µg/ml)	Concentrations (pg/ml)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	211.2±10.3 ^a	228.2±48.1	242.7±41.2	199.5±16.2
LPS+85% aq. MeOH 1	112.4±16.2 ^b	160.6±26.0	169.7±19.5	206.4±19.5
LPS+85% aq. MeOH 3	119.3±13.0 ^b	142.2±19.5	149.1±29.2	142.2±26.0
LPS+85% aq. MeOH 10	89.5±9.7 ^b	123.9±6.5	174.3±0.0	206.4±0.0

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

Table 4. Effect of 85% aqueous methanol fraction from dried mackerel on the production of Con-A induced tumor necrosis factor- α at different times in mouse spleen cells

Samples ($\mu\text{g/ml}$)	Concentrations (pg/ml)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con-A	32.1 \pm 6.5	114.7 \pm 13.0	174.3 \pm 19.5	181.2 \pm 16.2
Con-A+85% aq. MeOH 1	34.4 \pm 16.2	110.1 \pm 0.0	156.0 \pm 6.5	178.9 \pm 0.0
Con-A+85% aq. MeOH 3	18.4 \pm 6.5	98.6 \pm 3.2	192.7 \pm 13.0	224.8 \pm 26.0
Con-A+85% aq. MeOH 10	36.7 \pm 0.0	96.3 \pm 6.5	162.9 \pm 22.7	188.1 \pm 6.5

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; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction from dried mackerel.

Table 5. Effect of 85% aqueous methanol fraction from dried mackerel on the production of LPS induced interferon- γ at different times in mouse spleen cells

Samples ($\mu\text{g/ml}$)	Concentrations (pg/ml)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	0.0 \pm 0.0 ^c	1055.6 \pm 157.2 ^a	1027.8 \pm 39.3	2833.3 \pm 0.0 ^a
LPS+85% aq. MeOH 1	83.3 \pm 0.0 ^b	1250.0 \pm 117.8 ^a	1708.3 \pm 530.4	2166.7 \pm 117.9 ^b
LPS+85% aq. MeOH 3	0.0 \pm 0.0 ^c	1166.7 \pm 0.0 ^a	2083.3 \pm 471.4	1708.3 \pm 58.9 ^c
LPS+85% aq. MeOH 10	208.3 \pm 59.0 ^a	791.7 \pm 58.9 ^b	1166.7 \pm 117.9	1541.7 \pm 58.9 ^c

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; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction from dried mackerel

Table 6. Effect of 85% aqueous methanol fraction from dried mackerel on the production of Con-A induced interferon- γ at different times in mouse spleen cells

Samples ($\mu\text{g/ml}$)	Concentrations (pg/ml)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con-A	125.0 \pm 56.0 ^a	2000.0 \pm 235.7 ^a	3916.7 \pm 707.1	4333.3 \pm 942.8
Con-A+85% aq. MeOH 1	83.3 \pm 0.0 ^b	1416.7 \pm 353.6 ^b	3750.0 \pm 1060.7	4833.3 \pm 1414.2
Con-A+85% aq. MeOH 3	83.3 \pm 117.9 ^b	1791.7 \pm 294.6 ^{ab}	3833.3 \pm 353.6	4541.7 \pm 294.6
Con-A+85% aq. MeOH 10	83.3 \pm 117.9 ^b	1333.3 \pm 0.0 ^b	4083.3 \pm 707.1	4125.0 \pm 176.8

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; 85% aq. MeOH, 85% aqueous methanol fraction from dried mackerel.

을 확인할 수가 있었다. 그러나 IFN- γ 의 특성상 초기(6시간) 배양조건에서 LPS 단독으로는 IFN- γ 의 생성을 유도하지 않지만 배양시간 경과와 더불어 크게 증가하였으며 메탄올 추출물 소량(1 μg 첨가농도) 첨가는 배양시간이 경과되면서 LPS 단독군에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 이것은 세포성 면역증강 효과라고 볼 수 있다. 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물 농도별로 살펴보면 농도가 증가할수록 LPS에 의해 자극된 IFN- γ 의 생성을 감소시키는 경향을 나타내었다. 첨가농도별로 살펴보면 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물(1 및 3 μg 첨가농도)을 LPS와 함께 처리했을 때 24 및 72시간 배양했을 때 IFN- γ 의 생성량이 유의적으로 감소하였다(Table 5). Con-A의 경우 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물과 함께 처리했을 때 모든 첨가농도에서 Con-A만 처리한 대조군과 비교했을 때 생성량이 감소되는 것을 확인하였다(Table 6). 특히 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물을 6 및 24시간 배양했을 때 유의적

으로 Con-A에 의해 자극된 IFN- γ 의 생성량을 감소시켰다.

해양동물을 이용한 항염증 효과에 관한 연구는 다양하게 진행되어 있지 않다. 제한된 연구들 중 고등어와 함께 대표적인 등 푸른 생선인 참치의 항암활성 및 면역학적 연구에서 참치 에탄올 추출물은 *in vitro* 인체 장암세포 및 백혈병성 임파모세포의 증식을 억제하였으며 S-180 세포를 접종한 후 참치 추출물을 투여한 생쥐에서 용혈반형성 세포수와 혈청 단백질 중 immunoglobulin의 상대적 비율이 현저히 증가함을 관찰하여 생체 내에서 면역 증강효과를 나타내는 성분이 존재함을 보고하였다[11]. 또 다른 연구로 해양동물 중의 하나인 군소(*Aplysiakurocki*)를 이용한 연구로 군소로부터 추출한 다당분획물의 면역조절 효과를 검토한 결과 T cell line의 증식능에 대하여 농도가 증가함에 따라 증식능이 증가하는 효과와 RAW 264.7 cell line에 대하여 IL-12의 경우 47% 이상 증가하였음을 보고하였다. 본 연구자들도 참치 추출물 및 분획물에

의한 nitric oxide 및 pro-inflammatory 사이토카인의 생성 억제효과를 검토한 결과 참치 분획물들 중 85% aq. MeOH 분획물이 nitric oxide 생성과 LPS로 자극된 IL-6과 TNF- α 의 생성량을 유의적으로 감소시키므로써 항염증 효과를 나타내었다고 보고하였다[16]. 따라서 고등어 및 참치를 포함하는 등 푸른 생선은 대표적인 DHA 및 EPA의 공급원으로 인체 연구에 의하면 이들 n-3계 PUFA들이 IL-1, IL-6 및 TNF- α 와 같은 pro-inflammatory 사이토카인의 생성을 억제한다고 보고되었다[2, 5]. 지금까지 고등어에 대한 면역학적 연구는 미미하였으나 본 연구에서는 대표적인 서민 생선이며 DHA 및 EPA의 공급원인 고등어를 두 가지 자극물질, 즉 T 세포 증식자극 물질로서의 Con와 B 세포 자극물질로서 LPS를 이용하여 NO 생성 및 면역과정의 대사적 변화를 유도하는 IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 같은 염증유발 사이토카인의 생성에 대해 연구한 것으로 고등어의 식품영양학적 가치 측면에서 새로운 시도였다고 여겨진다. 따라서 이상의 결과로부터 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물은 nitric oxide 생성과 IL-6와 TNF- α 와 같은 pro-inflammatory 사이토카인의 생성을 감소시켜 염증반응을 예방할 것으로 기대되며 향후 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물을 더욱 정제하여 면역조절물질의 구조를 동정할 필요가 있다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부의 지원으로 수행한 해양에너지전문 인력양성사업과 2013년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2013R1A1A2004694)의 연구결과입니다.

References

- Axtelle, T. and Pribble, J. 2001. IC14, a CD14 specific monoclonal antibody, is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J Endotoxin Res* **7**, 310-314.
- Bouwens, M., van de Rest, O., Dellsscharft, N., Bromhaar, M. G., de Groot, L. C., Geleijnse, J. M., Muller, M. and Afman, L. A. 2009. Fish-oil supplementation induces anti-inflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* **90**, 415-424.
- Brown, K. L., Cosseau, C., Gardy, J. L. and Hancock, R. E. 2007. Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends Immunol* **28**, 260-266.
- Calder, P. C. 2008. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **79**, 101-108.
- Caughey, G. E., Mantzioris, E., Gibson, R. A., Cleland, L. G. and James, M. J. 1996. The effect on human tumor necrosis factor and an interleukin 1 β production of diets enriched in n-3 fatty acid from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* **63**, 116-122.
- Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. 2003. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin-2, and interleukin-6 by rat leukocyte subpopulation after exposure to substance P. *Neuropeptides* **37**, 355-361.
- De Smedt-Peyrusse, V., Sargueil, F., Moranis, A., Harizi, H., Mongrand, S. and Laye, S. 2008. 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.
- Feldmann, M., Brennan, F. M. and Maini, R. N. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* **14**, 397-440.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Logowski, G. J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**, 131-138.
- Hwang, S. A., Dasgupta, A. and Actor, J. K. 2004. Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to *Echinacea* extracts. *Clin Chim Acta* **343**, 161-166.
- Hwang, W. I., Baik, N. G., Hwang, Y. K. and Lee, S. D. 1992. Antitumor and immunological effects of tuna extracts. *J Korean Soc Food Nutr* **21**, 353-366.
- Jang, J. R., Choi, H. J., Kim, K. K. and Lim, S. Y. 2008. Effect of extracts from dried mackerel on antioxidant activity and inhibition of growth of human cancer cell lines. *J Life Sci* **18**, 680-685.
- Kaltschmidt, B., Sparna, T. and Kaltschmidt, D. 1999. Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal* **1**, 129-144.
- Khair-El-Din, T., Sicher, S. C., Vazquez, M. A., Chung, G. W., Stallworth, K. A., Kitamura, K., Miller, R. T. and Lu, C. Y. 1996. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. *J Exp Med* **183**, 1241-1246.
- Kim, J., Lee, C. M., Jeong, H. J., Kim, D. W. and Lee, K. Y. 2012. Elevated anti-inflammatory effects of eicosapentaenoic acid based self-aggregated glycol chitosan nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* **12**, 2672-2678.
- Kim, K. H., Choi, M. W., Choi, H. M. and Lim, S. Y. 2013. Effect of tuna extracts on production of nitric oxide and inflammatory cytokines. *J Korean Food Sci* **45**, 385-390.
- Kim, K. H., Kim, S. H. and Park, K. Y. 2001. 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* **6**, 126-132.
- Lazarov, S., Balutsov, M. and Ianev, E. 2000. The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock. *Vutr Boles* **32**, 33-40.
- Medina, I., Auboug, S. P. and Martin, R. P. 1995. Composition of phospholipids of white muscle of six tuna species. *Lipids* **30**, 1127-1135.
- Miyake, K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide

- by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* **12**, 186-192.
21. Murase, T. and Saito, H. 1996. The docosahexaenoic acid content in the lipid of albacore *Thunnusalalunga* caught in the two separate localities. *Fish Sci* **62**, 634-638.
 22. Palacios, R. 1982. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol* **361**, 98-106.
 23. Posadas, I., Terencio, M. C., Guilln, I., Ferrndiz, M. L., Coloma, J., Pay, M. and Alcaraz, M. J. 2000. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **361**, 98-106.
 24. Ruxton, C. H., Reed, S. C., Simpson, M. J. A. and Millington, K. J. 2004. The health benefits of omega- polyunsaturated fatty acids. *J Hum Nutr Diet* **17**, 449-459.
 25. Scott, M. G. and Hancock, R. E. 2000. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol* **20**, 407-431.
 26. Stokes, K. Y., Cooper D., Taylor, A. and Granger, D. N. 2002. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biol Med* **33**, 1026-1036.
 27. Tizard, I. R. 1986. *Immunology*, pp. 423-441, 2nd eds., Saunders College Publishing: An introduction inflammation, NY, USA.
 28. Weldon, S. M., Mullen, A. C., Loscher, C. E., Hurley, L. A. and Roche, H. M. 2007. 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.
 29. Wu, D., Meydani, S. N., Meydani, M., Hayek, M. G., Huth, P. and Nicolosi, R. J. 1996. Immunologic effects of marine- and plant-derived n-3 polyunsaturated fatty acids in nonhuman primates. *Am J Clin Nutr* **63**, 273-280.

초록 : Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 염증에 대한 건조 고등어 추출물의 항염증 효과

김광혁¹ · 최명원¹ · 최항미² · 임선영^{2*}

(¹고신대학교 의과대학 미생물학 교실, ²한국해양대학교 해양환경생명과학부)

본 연구에서는 건조 고등어 추출물 및 분획물들에 의한 nitric oxide 생성에 미치는 영향을 살펴보고 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물을 중심으로 면역과정의 생물학적 작용과 대사적 변화를 유도하는 IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 같은 pro-inflammatory 사이토카인의 생성을 측정하여 건조 고등어 추출물에 의한 항염증 효과에 대하여 검토하였다. 건조 고등어 추출물과 각 분획물은 control보다 낮은 nitric oxide 생성량을 나타내었으며, 특히 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane 분획물에 의한 저해효과가 높았다. 건조 고등어 분획물은 Con-A 보다는 LPS에 의해 자극된 IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 의 생성을 감소시키는데 더 효과적이었다. IL-6 및 TNF- α 의 생성은 배양시간 6시간 후 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물의 모든 첨가농도(1, 3 및 10 μ g)에서 감소되었다($p < 0.05$). IFN- γ 의 경우, 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물을 LPS와 함께 처리했을 때 특히 72시간 배양 시 IFN- γ 의 생성량이 농도 의존적으로 감소하였고 Con-A에 의해 자극된 IFN- γ 의 생성량은 6 및 24시간 배양 후 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 이상의 결과로부터 건조 고등어 85% aq. MeOH 분획물은 nitric oxide 생성과 pro-inflammatory 사이토카인(IL-6, TNF- α , and IFN- γ)을 감소시켜 염증반응을 예방할 것으로 기대된다.