

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포와 마우스 귀조직에 대한 참모자반 (*Sargassum fulvellum*) 에탄올 추출물의 항염증 효과

정다현¹ · 김꽃봉우리² · 김민지² · 강보경¹ · 박시우¹ · 박원민¹ · 김보람¹ · 안나경¹ · 최연욱¹ · 안동현¹

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract from *Sargassum fulvellum* on Lipopolysaccharide Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells and Mice Ears

Da-Hyun Jeong¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Min-Ji Kim², Bo-Kyeong Kang¹, Si-Woo Bark¹,
Won-Min Pak¹, Bo-Ram Kim¹, Na-Kyung Ahn¹, Yeon-Uk Choi¹, and Dong-Hyun Ahn¹

¹Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science and

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University

ABSTRACT This study investigated the anti-inflammatory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (SFEE) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response. SFEE remarkably suppressed production of NO and pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) at 50 and 100 μ g/mL. There were no cytotoxic effects on proliferation of macrophages treated with SFEE compared to the control. SFEE reduced expression of iNOS and COX-2 proteins in a dose-dependent manner. The formation of edema in mouse ears was reduced at the highest dose tested compared to the control. Moreover, in the acute toxicity test, no mortality occurred in mice administered 5,000 mg/kg body weight of SFEE over the 2-week observation period. These results suggest that SFEE may have significant effects on inflammatory factors and be a potential anti-inflammatory therapeutic material.

Key words: anti-inflammatory effect, NF- κ B, pro-inflammatory cytokines, *Sargassum fulvellum*

서 론

염증은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 재생하려는 기전으로(1), 일단 자극이 가해지면 염증 관련 세포에서 국소적으로 histamine, serotonin, prostaglandins, leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다(2). 그러나 염증이 치유되지 않고 만성으로 진행되면 조직손상을 촉진하고 일부에서는 암 발생 등의 질환까지 유발된다(3).

최근 질병을 예방 혹은 치료할 수 있는 기능은 식품이나 식물체도 가지고 있다는 것이 보고되고 있으며(4), 보다 건강하게 오래 살려는 인류의 필요성에 따라 근래에 이르러 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 다양한 자원으로부터 다

양한 생리기능을 가진 물질을 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(5). 따라서 염증 매개물질의 생성과 생성에 관여하는 효소의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증 질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다. 현재 천연물을 이용한 염증 반응 완화에 대한 연구로는 오가피(6) 등 생약재의 항염증에 관한 연구들과 청시닥나무(7), 홍화자(8), 왕귀퉁나무(9) 등의 육상식물에 대한 연구들이 주를 이루고 있다. 그러나 이러한 연구는 대부분 육상 식물을 대상으로 한 것으로 이미 한계치에 이르고 있으므로 새로운 건강 기능성 소재 개발을 위해서는 해양식물에 대한 연구가 필요하다.

모자반(*Sargassum fulvellum*)은 다년생 갈조류로 한국, 일본 등 동남아시아 일대에 분포되어 있으며 우리나라에서는 전 해안에서 폭 넓게 자생하고 있는 해조류이다. 우리나라에서 생육하는 모자반은 팽생이모자반, 알송이모자반, 파배기모자반, 큰잎모자반, 짝잎모자반 등 약 20여 종이 분포하고 있다(10). 모자반에 대한 생리활성 연구는 유기용매 추출을 통한 항균 실험과 열 및 pH 안정성에 대한 연구(11)와 유기용매 분획물의 항발암 효과 등에 관한 보고가 있으며(12), fucoidan의 항혈액 응고 특성에 대한 연구(13), 갈조류의 효소적 가수 분해물의 항산화 효과에 대한 연구(14,15)

Received 26 March 2014; Accepted 26 May 2014

Corresponding author: Dong-Hyun Ahn, Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
E-mail: dhahn@pknu.ac.kr, Phone: +82-51-629-5831

등이 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 모자반 에탄올 추출물을 이용하여 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서 염증 매개물질들의 생성 억제 효과를 측정하였으며, 아울러 항염증 활성을 갖는 기능성 식품으로의 가능성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 모자반은 부산 청사포에서 채취한 것으로 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후 이를 분말화하고 진공 포장하여 -20°C에서 저장하며 사용하였다.

모자반 추출물 제조

모자반 분말에 10배 양의 에탄올(95% ethanol)을 가하고, 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 24시간 추출하였다. 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 취하였고, 남은 잔사를 이와 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였다. 추출한 상층액은 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 사용하였다.

실험동물

생후 8주령의 수컷, ICR 마우스를 오리엔트바이오(Orient Co., Seongnam, Korea)로부터 구입하여 귀 부종 실험에 사용하였으며, 생후 10주령의 암컷, BALB/c 마우스는 단기 독성 평가 실험에 사용하였다. 마우스는 온도 20±2°C, 습도 50±10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 부경대학교 동물실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 득하여 수행하였다(승인번호 2014-01).

세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM에 10% inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

Nitric oxides 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess 반응(16)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포는 DMEM 배지를 이용하여 2.5×10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 µg/mL

의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL의 모자반 에탄올 추출물(SFEE)을 처리하여 24시간 재 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide+ 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader(Model 550, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

세포독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등(17)의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell 1×10⁶ cells/mL를 well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 1 µg/mL의 LPS와 SFEE를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL)로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo)에서 24시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 첨가하여 2시간 재 배양하고 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co.) 하여 상층액을 제거하였다. 그 후 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 microplate reader(Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density(O.D))를 측정하였다. 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation index (\%)} = \frac{\text{Sample 흡광도}}{\text{Control 흡광도}} \times 100$$

염증 관련 cytokines 분비량 측정

세포배양액 내의 TNF-α, IL-6 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF-α, IL-6 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating 시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤 각 microplate에 NO를 측정하였던 것과 동일한 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse TNF-α, IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1β의 경우 biotinylated anti-mouse IL-1β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후 이를 다시 PBST로 세척한 다음 OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 microplate reader(Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량 측정

배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, Sheeba와 Asha(18)의 방법에 따라 iNOS 및 COX-2의 경우 cytosol lysis buffer(50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 μ g/mL aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40)를 이용하였으며, NF- κ B의 경우 nucleus lysis buffer(10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol(DTT))를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였으며, 30 μ L의 lysate를 Laemmli(19)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등(20)의 방법을 참고하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(Bio-Rad)에 200 mA에서 1시간 동안 전사시킨 후, 5% skim milk가 포함된 TBST(tris buffered saline; pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking 하였다. iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 ECL 기질과 1~3분간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool(GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

SFEE의 항염증 효과를 *in vivo* 모델을 이용하여 검증하기 위하여 각각 Kim 등(21)과 Saraiva 등(22)의 방법에 의거하여 귀 부종 측정 및 조직 관찰을 진행하였다. ICR 마우스에 SFEE를 10, 50 및 250 mg/kg body weight 농도로 200 μ L씩 경구 투여하였다. 한 시간 후 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 μ L/ear 농도로 도포하였다. 귀 두께는 croton oil을 처리하고 5시간 후에 측정하였으며 croton oil 처리한 후 두께의 증가를 부종의 형성으로 간주하였다.

조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 SFEE를 100 mg/mL 농도로 20 μ L씩 도포하고 15분 뒤 5% croton oil을 20 μ L씩 도포하였다. 6시간 뒤 diethyl ether로 마취사 시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin 및 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다. 부종 생성율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Edema formation (\%)} = \frac{\text{Sample 구의 귀 두께}}{\text{Control 구의 귀 두께}} \times 100$$

단기 독성 평가

Balb/c 마우스를 실험 시작 전에 4~6시간 정도 절식시킨 후에 SFEE를 300, 2,000 및 5,000 mg/kg body weight 농도로 경구 투여하였다. 6시간 동안 비정상적인 행동 등의 경과를 관찰하였고 2주까지 지속적으로 관찰하였다.

통계처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (ver. 9.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test 법에 따라 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

Nitric oxide 생성 억제 효과

SFEE 처리에 의한 NO 생성 정도를 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화시킨 후, SFEE를 각 농도별(0.1, 1, 10, 50 및 100 μ g/mL)로 첨가하고 생성된 NO를 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. SFEE를 처리하였을 경우 NO 생성량이 LPS 처리구보다 유의적으로 감소함을 확인하였다. Positive control의 경우 negative control과 비교하여 7배 이상 분비량이 증가하였으나, 10, 50 및 100 μ g/mL 농도에서는 50% 이상 감소한 것을 확인하였다(Fig. 1A). 일반적으로 에탄올 추출 시에 유기 용매에 추출되는 소수성 물질과 가용성인 친수성 물질이 모두 추출되는 것으로 알려져 있는데(23), 선행연구(24)에서 80% 에탄올을 이용해 추출한 SFEE의 항염증 효과를 확인한 바 있어 NO 생성을 저해하는 물질이 에탄올에 용출이 잘 되는 소수성 물질일 것으로 추측하여, 본 연구에서는 95% 에탄올을 이용하여 실험을 진행하였다. 본 연구 결과는 팽생이 모자반(*Sargassum honeri*) 에탄올 추출물 처리에 따라 농도 의존적으로 NO 분비량 감소를 보인 결과(25)와 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*)으로부터 분리된 fucoxanthin이 높은 NO 저해능을 보인 연구 결과(26)와 유사함을 확인하였다.

세포독성 측정

염증 반응에 관여하는 주요 세포는 macrophage로 알려져 있으며, 여러 자극이나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화되어 통증, 부종, 열 등의 염증 반응을 유발하고 염증 부위로 면역 세포의 이동을 촉진시킨다(27). 따라서 본 연구에서는 염증에 중요한 역할을 하는 대식세포에 대해 SFEE의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. SFEE를 0.1, 1, 10, 50 및 100 μ g/mL의 농도로 첨가하여 배양한 결과, 모든 처리 농도에서 RAW 264.7 세포 증식능이 negative control에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하여 세포독성을 가지지 않음을 확인하였다(Fig. 1B). 이는 청시닥나무(*Acer barbinerve*) 추출물에 대한 세포독성 실험 결과, 농도 의존적으로 세포 증식률

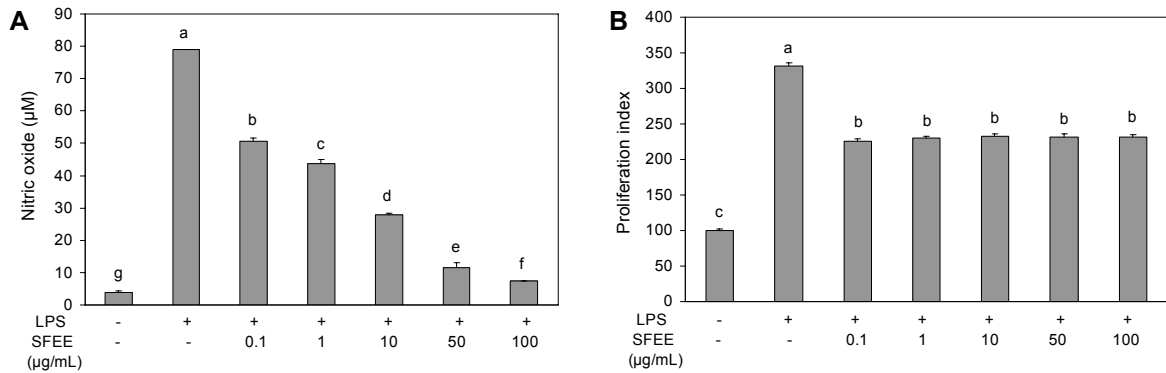


Fig. 1. The *in vitro* anti-inflammatory effects of SFEE in RAW 264.7 cells. (A) The levels of NO determined from the culture supernatant of RAW 264.7 cells. (B) The cell viability of RAW 264.7 cells. Proliferation index=(sample O.D/ control O.D)×100. Means with different letters (a-g) above bars are significantly different ($P<0.05$).

이 증가하는 경향을 보였으나 세포독성은 나타나지 않은 결과와 유사하다(7).

염증 관련 cytokines 생성 억제 효과

인체에서 염증 반응이 진행되기 위해서는 NO, PGE2와 같은 염증 매개물 이외에 면역 반응에서 필연적으로 염증성 cytokine이 동반되는데, 대표적인 cytokine으로는 IL-6, TNF-α 및 IL-1β이다(8). 따라서 SFEE가 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후, SFEE를 농도별로 처리하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 IL-6, TNF-α 및 IL-1β 모두 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. IL-6 및 IL-1β의

경우 positive control과 비교하여 SFEE를 1 µg/mL 농도로 처리하였을 때, SFEE 처리구가 50% 이상의 높은 감소를 보임을 확인할 수 있었다. 또한 TNF-α의 경우 positive control과 비교하여 SFEE의 농도가 높아짐에 따라 TNF-α 분비량이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이는 썬바귀 추출물 첨가 시 RAW 264.7 세포 실험에서 TNF-α의 분비량이 첨가 농도에 의해 감소하는 경향을 보임에 따라 IL-1β의 분비량 또한 감소한 연구 결과와 유사하다(28). 다른 연구로 애기땅빈대(29)와 청서익기탕(28) 추출물 처리 농도가 500 µg/mL에서 LPS 단독 처리구에 비해 IL-6 분비량이 약 50% 이상 감소한 결과를 보인 것과 비교해 볼 때, SFEE의 경우에는 1 µg/mL의 비교적 낮은 농도에서 70%

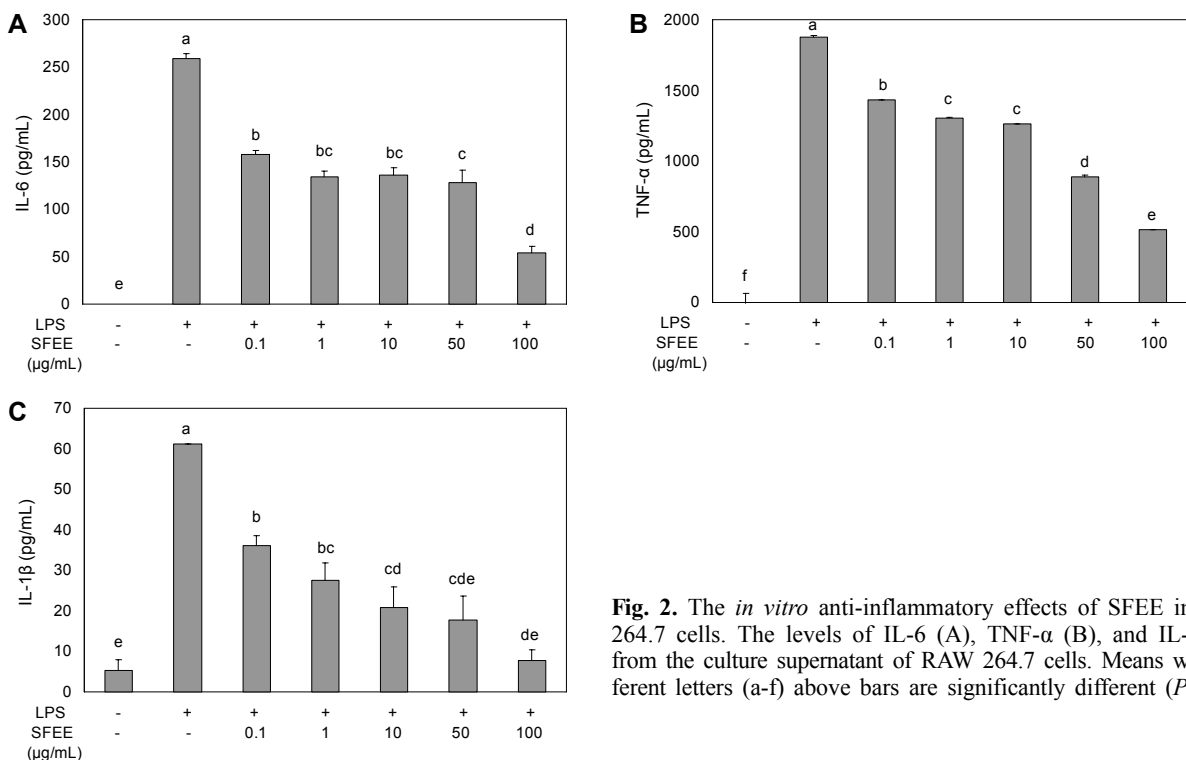


Fig. 2. The *in vitro* anti-inflammatory effects of SFEE in RAW 264.7 cells. The levels of IL-6 (A), TNF-α (B), and IL-1β (C) from the culture supernatant of RAW 264.7 cells. Means with different letters (a-f) above bars are significantly different ($P<0.05$).

이상의 IL-6 분비량 감소를 보임에 따라 육상식물이나 한약재보다도 해양생물에서부터 유래된 SFEE가 항염증 기능성 물질로의 높은 가능성을 가지고 있다고 사료된다.

iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현 억제 효과

iNOS는 외부자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 의해 자극받게 되면 hepatocyte, smooth muscle cells, bone marrow cells, monocytes, macrophages 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생산한다고 보고되고 있다(30). COX는 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 prostaglandin으로의 변화를 촉진시키는 효소로써 COX-1, COX-2의 isoform이 존재한다(31). COX-1은 대부분의 조직에서 발현되어 인체의 항상성 유지에 관여하는 반면, COX-2는 growth factors, cytokines 및 lipopolysaccharide 등의 다양한 자극에 의해서 macrophage나 monocyte 등의 세포에서만 다량 발현되며, 이로 인해 발생된 prostaglandin은 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다(32,33). 또한 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 nuclear transcription factor- κ B(NF- κ B)는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 transcription factor이다(34). NF- κ B는 p50과 p65로 구성되어 핵 안으로 들어가 전사인자로서 작용하여 iNOS, COX-2 및 염증관련 cytokine을 합성하며, 일반적으로 세포질에서 I κ B α 와 결합함으로써 NF- κ B의 작용이 억제된다(35). 따라서 염증 반응에서 생성되는 물질 중 iNOS, COX-2, NF- κ B와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있다.

본 연구에서는 RAW 264.7 세포에 SFEE를 0.1~100 μ g/

mL 농도로 처리하고 iNOS 발현량을 측정된 결과(Fig. 3A), positive control과 비교하였을 때 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수가 있었으며 특히 50~100 μ g/mL 농도에서 PBS 처리구와 유사한 발현량을 나타냈다. 또한 RAW 264.7 세포에 SFEE를 0.1~100 μ g/mL 농도로 처리하고 COX-2 발현량을 측정된 결과(Fig. 3B), SFEE를 100 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 LPS 단독 처리구에 비해 약 60% 이상의 억제 효과를 나타냈다. 동일한 방법으로 NF- κ B 발현량을 비교한 결과(Fig. 3C), SFEE 처리 시 positive control에 비해 발현량이 농도 의존적으로 감소함을 보였으며, 100 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 약 50%의 억제 효과를 나타냄을 확인했다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 SFEE는 LPS에 의해 형성되는 NF- κ B의 활성 억제를 통해 iNOS 및 COX-2 발현을 억제시키고 결과적으로 PGE2와 NO 생성을 억제함으로써 항염증에 효과가 있을 것으로 사료된다.

귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

피부의 손상된 부위를 복구시키려는 일련의 생체 과정으로서 혈관확장, 부종 등의 생리 현상이 나타나며 이는 피부 염증에서 일어나는 대표적인 반응으로 이 반응을 억제하는 효과를 실험적으로 검증함으로써 특정 약리 물질의 항염증 효과를 증명할 수 있다(36). SFEE를 10, 50 및 250 mg/kg 농도로 200 μ L씩 경구 투여한 후 croton oil로 염증을 유발하고 귀 두께를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Control과 비교하여 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소한 것을 확인하였다. 특히 SFEE 250 mg/kg 농도에서 positive control인 prednisolone 처리구와 비교하였을 때, 현재 사용되고 있는 합성 스테로이드제인 prednisolone 50 mg/kg

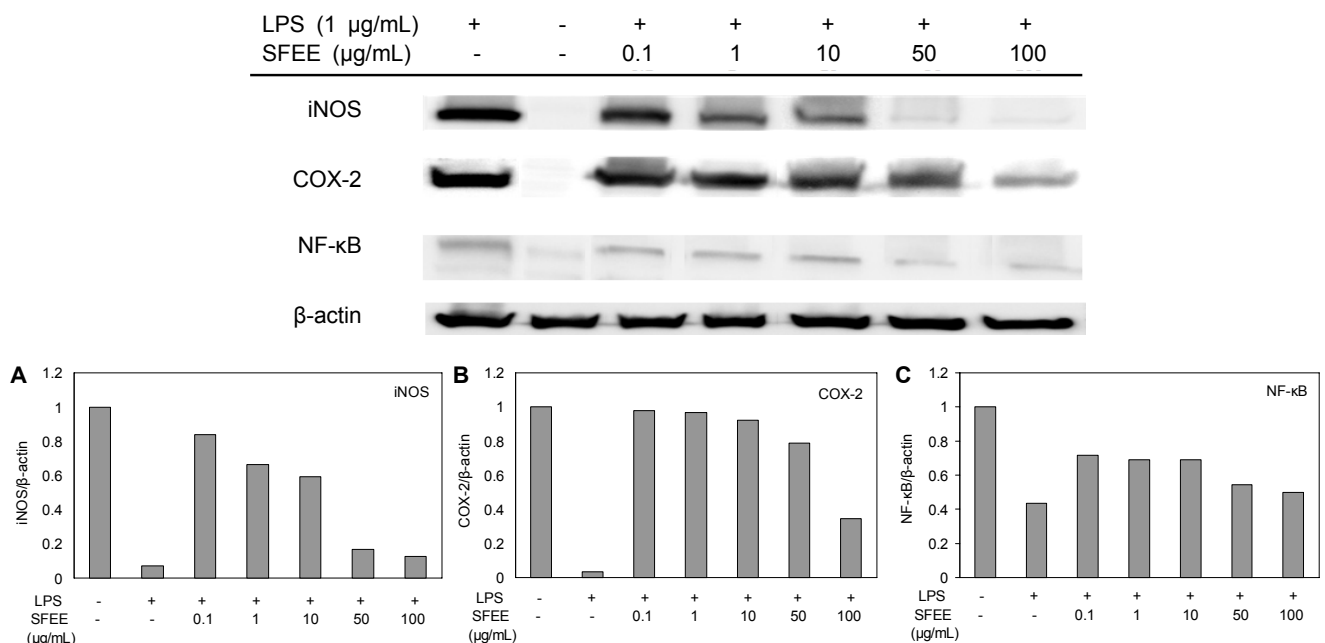


Fig. 3. Effect of SFEE on LPS-induced iNOS (A), COX-2 (B), and NF- κ B (C) expression in RAW 264.7 cells.

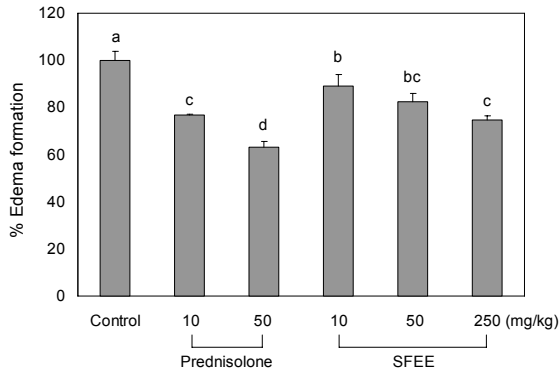


Fig. 4. Inhibition of SFEE against croton oil-induced mouse ear edema. Means with different letters (a-d) above bars are significantly different ($P<0.05$).

경구 투여 시와 유사한 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 *Stephania tetrandra*(방기)의 fangchinoline과 tetrandrine을 20~80 mg/kg 농도로 처리한 결과(37)와 유사한 경향을 나타냈다. SFEE의 귀 부종 억제 효과는 조직 관찰 결과에서도 나타났는데, croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에서 croton oil만을 처리한 경우에 비해 SFEE를 100 mg/mL 농도로 처리한 경우 prednisolone 처리구와 유사한 정도로 경피 및 진피 두께가 얇아진 것을 확인하였으며(Fig. 5A(c), toluidine-blue 염색을 통해 조직 내 mast cell 침윤 정도를 확인한 결과(Fig. 5B) SFEE의 처리가 조직 내 mast cell 침윤을 현저히 억제함을 확인하였다. 통증 및 염증의 완화에는 비스테로이드성 소염진통제가 주로 사용되지만 부작용(38)이 보고된 바 있다. 따라서 SFEE를 식이함으로써 염증 반응 중 하나인 부종에 효과가 있는 것으로 미루어 보아, SFEE는 염증 치료제의 소재로 이용될 가치가 충분할 것으로 사료된다.

Table 1. Mortality of mice treated orally with SFEE

	Days after treatment							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
300 mg/kg body weight	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2,000 mg/kg body weight	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5,000 mg/kg body weight	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

단기 독성 평가

천연 식물은 예로부터 여러 가지 민간요법으로 사용 또는 섭취가 되어오면서 효능이 검증되어 왔고, 최근에 와서 현대 의학의 대체 요법으로 사용이 되고 있다. 선진국에서는 이미 전 세계 자원 식물에 대한 치료 또는 예방 기능과 경제적 효용 가치를 평가하여 보다 다양한 식품 종의 확보에 주력하고 있다(39). 따라서 국민들의 건강에 대한 관심 증가와 더불어 각종 만성질환에 대한 관심이 증가하였다. 최근 의약품으로 인해 일어날 수 있는 부작용을 최소화시키고 건강을 유지시키거나 질병을 예방할 수 있는 기능성 식품의 활용이 증가하고 있으며 기능성 식품 시장은 지속적으로 확대되고 있다(40,41).

본 연구에서는 SFEE를 300, 2,000 및 5,000 mg/kg 농도로 200 µL씩 경구 투여하고 2주간 행동 변화 및 치사율을 관찰하였다(Table 1). 경구 투여 후 4시간까지 행동 변화를 관찰하였을 때 5,000 mg/kg 농도 처리구 2개체에서 30분 정도 약간 흥분 상태를 보였으나 1시간 이후 진정하였고, 2주간 치사율은 0%로 나타났다. 유사한 연구로 흰점박이꽃무지의 기능성 식품 재료로서의 활용 가능성을 검증하기 위해 단기 독성 평가를 실시한 결과 그 안전성을 검증하였다(42). 따라서 동물실험을 통해 SFEE가 인체에도 무해할 것으로 사료되며 새로운 기능성 식품 소재로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

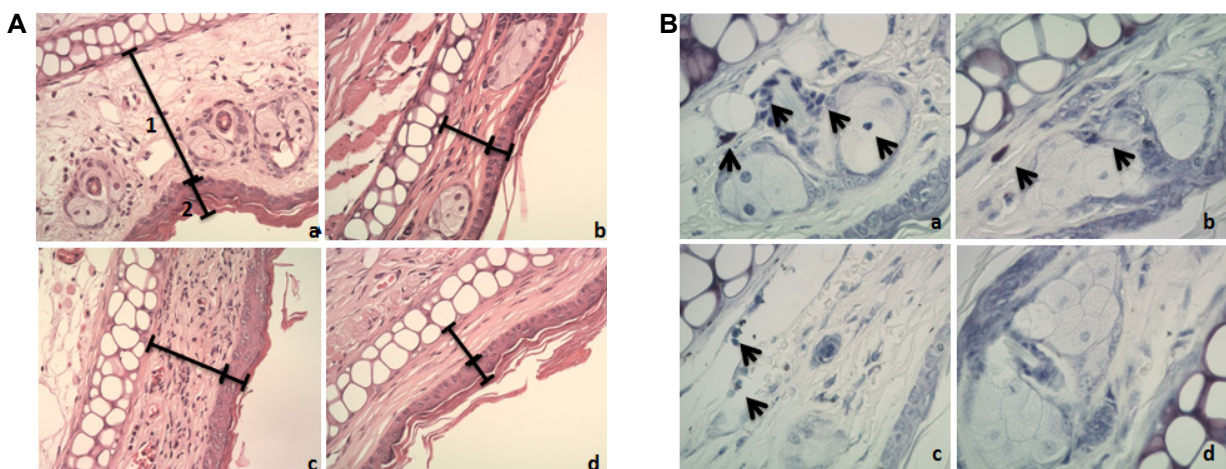


Fig. 5. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of 5% croton oil (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) and examined under light microscopy (magnification: $\times 200$). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b) and *Sargassum fulvellum* ethanol extract 100 mg/mL, 20 µL/ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively.

요 약

본 연구에서는 천연식물자원인 참모자반 에탄올 추출물(SFEE)의 항염증 활성을 알아보기 위하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 진행하였다. 먼저 SFEE의 세포독성을 살펴보기 위하여 RAW 264.7 대식세포를 이용하여 세포 생존율을 살펴본 결과, SFEE 100 µg/mL의 농도까지 전혀 독성을 나타내지 않았다. 또한 항염증 효과를 알아보기 위하여 *in vitro* type으로 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 대하여 NO, IL-6, TNF-α 및 IL-1β 분비량과 iNOS, COX-2 및 NF-κB와 같은 염증성 단백질의 발현량을 측정하였다. 대식세포 배양액의 NO₂⁻ 농도를 측정된 결과 SFEE 첨가 농도에 따라 유의적으로 분비량이 감소하는 것을 확인하였으며, 100 µg/mL의 농도에서 90% 이상 억제됨을 확인하였다. 또한 100 µg/mL의 농도로 첨가 시 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF-α 및 IL-1β 분비량을 각각 79, 73, 87% 억제함을 확인하였으며, NO 생성과 연관이 있는 iNOS 단백질과 COX-2 및 NF-κB 단백질의 발현이 현저히 억제됨을 확인하였다. 이러한 SFEE의 항염증 효과를 동물모델에서 확인하기 위해 *in vivo* 실험을 진행한 결과 croton oil로 유도한 마우스 귀 부종을 유의적으로 억제함을 확인하였고, 조직검사 결과 염증 반응에 의한 경피 및 진피 두께의 발달을 현저히 억제시키고 염증성 세포인 비만세포의 조직으로의 침윤을 억제하여 항염증 효과를 가짐을 입증하였다. 결론적으로 참모자반 에탄올 추출물은 염증 반응의 전사인자인 NF-κB의 발현을 억제하여 iNOS와 COX-2의 발현을 억제시키고 그에 의해 NO, IL-6, TNF-α 및 IL-1β 분비를 억제하여 항염증 활성을 가지는 것을 확인하였으며, 따라서 참모자반 에탄올 추출물이 염증성 질환의 예방 및 개선에 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것으로 이에 감사드립니다(No. 2012R1A6A1028677).

REFERENCES

1. Tizard IR. 1988. *Immunology; An introduction*. 2nd ed. Saunders College Publishing, New York, NY, USA. p 423-441.
2. Willoughby DA. 1975. Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis* 34: 471-478.
3. Hofseth LJ, Ying L. 2006. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1765: 74-84.
4. Lin RI-S. 1994. Phytochemicals and antioxidants. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Goldberg I, ed. Chapman & Hall, New York, NY, USA. p 393.
5. Lee SE, Bang JK, Song J, Seong NS, Park HW, Chung HG, Kim GS, An TJ. 2004. Inhibitory activity on angiotensin converting enzyme (ACE) of Korean medicinal herbs. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 73-78.
6. Lee KH, Nam JO, Yoon WH. 2007. Effects of protein-bound polysaccharide isolated from *Acanthopanax senticosus* in reducing the toxic effects of cisplatin. *Korean J Pharmacogn* 38: 1-17.
7. Lee HN, Kim JK, Kwon GT, Shim JH, Kim JD, Yoon JH. 2012. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from bark of *Acer barbinerve* Maxim. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1242-1247.
8. Kim DH, Hwang EY, Son JH. 2013. Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorious* seed extracts in RAW 264.7 cells. *J Life Sci* 23: 55-62.
9. Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park P, Jeong JH. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1205-1210.
10. Kang SH, Cho EK, Choi YJ. 2012. α-Glucosidase inhibitory effects for solvent fractions from methanol extracts of *Sargassum fulvellum* and its antioxidant and alcohol-metabolizing activities. *J Life Sci* 22: 1420-1427.
11. Tibbot BK, Skadsen RW. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α-glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* 30: 229-241.
12. Bae SJ. 2004. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 480-486.
13. Kong CS, Um YR, Lee JI, Kim YA, Lee JS, Seo YW. 2008. Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 177-182.
14. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol* 96: 1613-1623.
15. Heo SJ, Jeon YJ. 2005. Antioxidant effect and protecting effect against cell damage by enzymatic hydrolysates from marine algae. *Food Industry and Nutrition* 10: 31-41.
16. Lee 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.
17. Park YM, Won JH, Yun KJ, Ryu JH, Han YN, Choi SK, Lee KT. 2006. Preventive effect of *Ginkgo biloba* extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor-κB in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 29: 985-990.
18. Sheeba MS, Asha VV. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF-α and iNOS expression, which is mediated by NF-κB regulation, in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 124: 39-44.
19. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
20. Towbin HT, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
21. Kim DW, Chi YS, Son KH, Chang HW, Kim JS, Kang SS, Kim HP. 2002. Effects of sophoraflavanone G, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2

- and in vivo inflammatory response. *Arch Pharm Res* 25: 329-335.
22. Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, Menezes KD, Leite GO, Kerntopf MR, Costa JG, Rocha JB, Tomé AR, Campos AR, Menezes IR. 2011. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *J Ethnopharmacol* 136: 504-510.
 23. Lee SH, Oh HY, Leem JY, Yoon S. 2009. Antioxidant and NO-scavenging activities of *Acantopanax senticosus* var. *subinermis* leaf extracts prepared using ethanol and extrusion processing. *Food Sci Biotechnol* 18: 1124-1131.
 24. Kim MJ. 2012. Anti-inflammatory activity of the *Sargassum fulvellum* and *Sargassum sagamianum* ethanol extracts. *MS Thesis*. Pukyong National University, Busan, Korea. p 12-35.
 25. Lee CJ. 2010. Inhibitory effects of *Sargassum horneri* extracts on atopic disease. *MS Thesis*. Pukyong National University, Busan, Korea. p 18-39.
 26. Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, Ahn GN, Kang SM, Kang DH, Affan A, Oh C, Jung WK, Jeon YJ. 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 48: 2045-2051.
 27. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biol Pharm Bull* 27: 617-620.
 28. Lee E. 2011. Effects of *Ixeris dentata* extract on the production of pro-inflammatory cytokines in the LPS stimulated rat and Raw 264.7 cells. *Korean J Plant Res* 24: 604-612.
 29. Park SC, Son DY. 2011. Inhibitory effects of *Euphorbia supina* Rafin on the production of pro-inflammatory mediator by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 486-492.
 30. Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim A. 2007. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF- κ B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells* 23: 398-404.
 31. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69: 145-182.
 32. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Mitchell JA. 2002. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21: 93-101.
 33. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12013-12017.
 34. Ghosh S, Hayden HS. 2008. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8: 837-848.
 35. Majdalawieh A, Ro HS. 2010. Regulation of I κ B α function and NF- κ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflamm* 2010: 823821.
 36. Hahm DH, Sur BJ, Han DO, Park JH, Jung ET, Lee HJ, Koh YJ, Choi HD. 2008. Anti-inflammatory activity of dandelion in mice. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 22: 810-814.
 37. Choi HS, Kim HS, Min KR, Kim Y, Lim HK, Chang YK, Chung MW. 2000. Anti-inflammatory effects of fangchinoline and tetrandrine. *J Ethnopharmacol* 69: 173-179.
 38. Sánchez-Borges M. 2010. NSAID hypersensitivity (respiratory, cutaneous, and generalized anaphylactic symptoms). *Med Clin North Am* 94: 853-864.
 39. KHIDI. 2006. The tendency of research and development of internal and external natural source remedies. The second: plan for promotion of natural medicine research & development. Korea Health Industry Development Institute, Osong, Korea. p 1-20.
 40. Choi SK, Choi HS. 2004. Purification and characterization of and anticoagulant from corn silk. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1262-1267.
 41. Ko EM, Kim BY. 2004. Antimicrobial activity of ϵ -polylysine mixtures against food-borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 705-710.
 42. Park JH, Kim SY, Kang MG, Yoon MS, Lee YI, Park EJ. 2012. Antioxidant activity and safety evaluation of juice containing *Protoetis brevitarsis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 41-48.