

Anti-inflammatory Activity of *Sargassum micracanthum* Water Extract

Da Hyun Jeong · Bo Kyeong Kang · Koth Bong Woo Ri Kim · Min Ji Kim · Dong Hyun Ahn*

잔가지 물 추출물의 항염증 효과

정다현 · 강보경 · 김꽃봉우리 · 김민지 · 안동현*

Received: 16 October 2013 / Accepted: 9 February 2014 / Published Online: 30 September 2014

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2014

Abstract The anti-inflammatory effect of *Sargassum micracanthum* water extract (SMWE) was investigated using lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in this study. The murine macrophage cell line RAW 264.7 cells were used and MTT assay was performed to measure the cell proliferation ability. The secretion of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and IL-1 β was measured in LPS-induced RAW 264.7 cells by ELISA. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and nuclear transcription factor-kappa B p65 protein was studied by immunoblotting. The Balb/c mice were used for an acute toxicity test, and imprinting control region mice were purchased to evaluate a croton oil-induced ear edema. As a result, there was no cytotoxicity in the macrophage proliferation treated with SMWE compared to the control. NO levels decreased with increasing concentration of SMWE and were inhibited over 50%. Moreover, the secretion of IL-6, TNF- α , and IL-1 β was suppressed in a dose-dependent manner, especially, IL-1 β inhibition activity was over 50% at 50 μ g/mL. The formation of ear edema of mice was reduced at the

highest dose tested compared to that in the control. Moreover, in acute toxicity test, no mortalities occurred in mice administered 5,000 mg/kg body weight of SMWE over 2 weeks observation period. These results suggested that SMWE may have significant effects on inflammatory factors and be potential anti-inflammatory therapeutic materials.

Keywords anti-inflammation · ear edema · nuclear transcription factor-kappa B · *Sargassum micracanthum*

서 론

최근 경제가 발전함에 따라 생활환경 및 식생활의 변화로 인하여 전 세계적으로 암, 당뇨병, 고혈압, 비만 및 혈관성 질환 등의 생활습관 병이 차지하는 비율이 매년 증가하고 있다. 이와 더불어, 현대 사회의 급격한 산업 발달로 인한 환경 변화 그리고 이에 따른 스트레스의 증가 등을 포함하여 다양한 요인으로 인하여 면역 조절 이상으로 유발된 염증이 지속됨으로써 아토피, 천식 등의 만성 염증 질환이 증가하고 있다 (Heinzemann과 Daser, 2002; Sung 등, 2012).

염증 반응에 관여하는 주요 세포는 macrophage로 알려져 있으며, 여러 자극이나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화 되어, 통증, 부종, 열 등의 염증 반응을 유발하고, 염증 부위로 면역 세포의 이동을 촉진시킨다(Lee 등, 2004). RAW 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)의 자극에 의해 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 IL-6와 같은 염증매개성 cytokine들의 분비를 촉진한다. 이러한 염증 매개 물질들의 형성은 arachidonic acid가 cyclooxygenase (COX)의 작용을 거쳐 leukotriene, thromboxane,

D. H. Jeong · B. K. Kang · D. H. Ahn
Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science,
Pukyong National University, Republic of Korea

K. B. W. R. Kim · M. J. Kim
Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Republic of
Korea

*Corresponding author (D. H. Ahn: dhahn@pknu.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.

prostaglandin 등으로 바뀌는 과정 및 nitric oxide (NO)의 대량 생성에 관여함으로써 염증매개에 큰 역할을 하며, 숙주에 치명적 결과를 초래한다고 알려져 있다(McDaniel 등, 1996; Kim 등, 2009).

특히 iNOS는 외부자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 hepatocytes, smooth muscle cells, bone marrow cells, monocytes, macrophages 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생산한다고 보고되고 있다(Lee 등, 2007). COX는 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 prostaglandin으로의 변화를 촉진시키는 효소로서 COX-1, COX-2의 isoform이 존재한다(Smith 등, 2000). COX-1은 대부분의 조직에서 발현되어 인체의 항상성 유지에 관여하는 반면, COX-2는 growth factors, cytokines 및 LPS 등의 다양한 자극에 의해서 macrophage나 monocyte 등의 세포에서만 다량 발현되며, 이로 인해 발생한 prostaglandin은 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다(Seibert 등, 1994; Bishop-Bailey 등, 2002). 또한, 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 nuclear transcription factor-kappa B (NF-κB)는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 transcription factor이다(Ghosh와 Hayden, 2008). NF-κB는 p50과 p65로 구성되어 핵 안으로 들어가 전사인자로서 작용하여 iNOS, COX-2 및 염증관련 cytokine을 합성하며, 일반적으로 세포질에서 inhibitor kappaB-alpha (IκBα)와 결합함으로써 NF-κB의 작용이 억제된다(Majdalawieh와 Ro, 2010).

현재 천연물을 이용한 염증반응 완화에 대한 연구로는 구관(Baek 등, 2012), 오가피(Lee 등, 2007), 금은화(Yun 등, 2007) 등 생약재의 항염증에 관한 연구들과 청시닥나무(Lee 등, 2012a), 등골나무(Lee 등, 2011), 홍화자(Kim 등, 2013), 왕취뽕나무(Kim 등, 2012b), 녹두 및 대두(Imm과 Kim, 2010) 등의 육상식물에 대한 연구들이 주를 이루고 있다. 하지만 이러한 연구는 대부분 육상 식물을 대상으로 한 것으로 이미 한계에 이르러 있으므로 새로운 건강 기능성 소재 개발을 위해서는 해양식물에 대한 연구가 필요하다. 이는 해조류가 극심한 환경에서 생육하므로 육상 식물과는 다른 성분과 생리활성이 있을 것으로 추측되기 때문이다(Cho와 Choi, 2010).

본 연구에서 사용 한 잔가시 모자반(*Sargassum micracanthum*)은 모자반목 모자반과에 속하는 갈조류로 우리나라 인근 해역에서 쉽게 채취할 수 있는 대표적인 해조류이다. 잔가시 모자반에 관한 연구로는 항비만(Lee 등, 2012b) 및 항산화(Ham 등, 2010; Kim 등, 2012a)에 관한 일부 연구가 수행되고 있다. 이에 본 연구에서는 잔가시 모자반 물 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

원료. 잔가시 모자반(*S. micracanthum*)은 부산 연화리에서 채취한 것으로 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후, 이를 분말화 하고 진공 포장하여 -20°C에서 저장하며 사용하였다.

실험동물. 생후 8주령의 수컷, imprinting control region (ICR) 마우스를 오리엔트바이오(Orient Co., Korea)로부터 구입하여 귀 부종 실험에 사용하였으며, 생후 10주령의 암컷, Balb/c 마

우스는 단기 독성 평가 실험에 사용하였다. 마우스는 온도 20±2°C, 습도 50±10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다.

시약. Fetal bovine serum (FBS), penicilline-streptomycin은 Hyclone (USA)에서, TNF-α, IL-6 및 IL-1β ELISA kit는 BD Bioscience (USA)에서 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지는 GIBCO (USA)에서 구입하여 사용하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO), LPS, 3-(4,5-dimethyl-thiazol 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent는 Sigma사(USA)에서 구입하였으며, iNOS, COX-2, NF-κB 및 β-actin의 항체와 anti-mouse IgG conjugated horseradish peroxidase는 Santa Cruz (USA)에서 구입하여 사용하였다. BCA protein assay kit 및 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)는 Pierce (USA) 제품을 구입하여 실험에 이용하였다.

추출물 제조. 분말 상태의 잔가시 모자반에 10배량의 증류수를 가한 후 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Korea)를 이용하여 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 이를 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하고 잔사를 이와 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였다. 추출한 상층액은 여과지로 여과하여 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamato Co., Japan)로 농축한 뒤 건조하였다. 건조된 시료는 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

세포배양. Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071)에서 분양 받아 사용하였으며, DMEM에 10% inactivated FBS와 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.

세포 독성 측정. 시료의 세포독성을 평가 하기 위해 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell (1×10⁶ cells/mL)를 well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 1 μg/mL의 LPS와 잔가시 모자반 물 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50 및 100 μg/mL)로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Japan)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., Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 microplate reader (Model 550, Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density (O.D.))를 측정하였다. 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation index (\%)} = \text{sample 흡광도/control 흡광도} \times 100$$

NO 생성량 측정. NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess 반응(Lee 등, 2000)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell은 DMEM 배지를 이용하여 2.5×10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 μg/mL의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL의 잔가시 모자반 물 추출물을 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 reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

염증 관련 cytokines 분비량 측정. 세포배양액 내의 TNF-α, IL-6 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF-α, IL-6 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 NO를 측정 하였던 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 반응 시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS, COX-2 및 NF-κB p65 발현량 측정. 세포질 내 생성된 iNOS, COX-2 단백질 및 세포질에서 핵으로 이동하는 NF-κB p65의 양을 측정하기 위하여 cytosolic extraction lysis buffer와 nuclear extraction lysis buffer를 각각 첨가하고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 핵과 세포질을 분리 한 후 실험에 사용 하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, IL, USA)를 사용하여 정량 하였으며, 30 μL의 lysate를 Laemmli (1970)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등(1979)의 방법을 참고하여 polyvinylidene difluoride membrane (Bio-rad)에 200 mA에서 1시간 동안 전사시킨 후, 5% skim milk가 포함된 tris buffered saline (TBST; pH7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. iNOS, COX-2 및 NF-κB p65의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF-κB p65를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 ECL 기질과 1-3분 간 반응 후 GeneGnome5 image analysis system (Syngene, UK)을 이용하여 감광하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰. ICR 마우스에 잔가시 모자반 물 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg · body weight 농도로 200 μL 씩 경구 투여 하였다. 한 시간 후, 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 μL/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 잔가시 모자반 물 추출물을 100 mg/mL 농도로 20 μL씩 도포하고 15분 뒤, 5% croton oil을 20 μL씩 도포하였다. 6시간 뒤, diethylether로 마취사 시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin과 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

단기 독성 평가. Balb/c 마우스를 실험 시작 전에 4–6시간 정

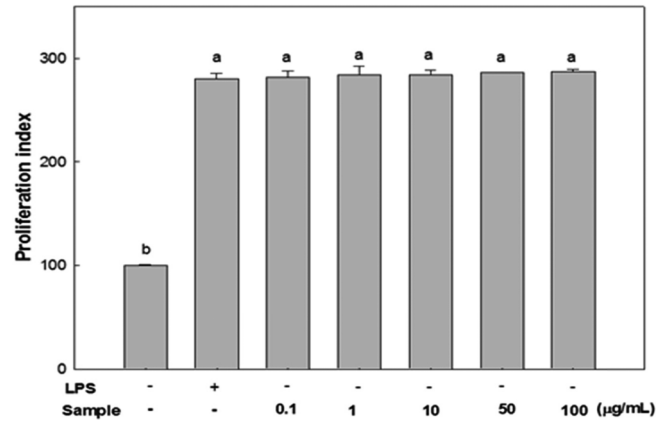


Fig. 1 Effect of *Sargassum micracanthum* water extract on the proliferation of RAW 264.7 cells. Proliferation index = sample O.D/ control O.D*100. ^{a,b}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

도 절식시킨 후에 잔가시 모자반 물 추출물을 300, 2,000 및 5,000 mg/kg body weight 농도로 경구 투여 하였다. 6시간 동안 비정상적인 행동 등의 경과를 관찰하였고 2주까지 지속적으로 관찰하였다.

통계처리. 모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (SAS Institute, Inc., USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test법에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

세포 독성 측정. 대식세포는 염증 반응 시에 NO와 같은 활성 산소종 및 IL-6, TNF-α 및 IL-1β와 같은 염증성 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하므로 항염증 효과를 검증하는 염증 모델로 많이 사용된다(Higuchi 등, 1990; Willeaume 등, 1996). 잔가시 모자반 물 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT 방법을 이용하였다. 그 결과, 모든 처리 농도에서 RAW 264.7 세포 증식능이 negative control에 비해 유의적으로 증가한 것을 확인하였으며, LPS 단독 처리 시와 유사하게 증식하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이는 왕취뚱나무잎 물 추출물 및 에탄올 추출물의 세포 독성 평가 결과와 유사하며(Kim 등, 2012b), 홍화자 분획물의 대식세포에 대한 독성 결과와도 유사함을 나타내었다(Kim 등, 2013). 따라서 잔가시 모자반 물 추출물은 0.1-100 μg/mL에서 높은 세포 생존율을 보여 독성이 없는 것으로 사료된다.

NO 생성 억제 효과. NO는 NO 합성 효소에 의해 L-arginine 으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역 반응, 세포독성, 신경 전달계 및 혈관 이완 등 여러 생물학적인 과정에 관여하며 농도에 따라 세포 기능 유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포 독성을 일으키기도 한다(Kim 등, 2004). 잔가시 모자반 물 추출물 처리에 의한 NO 생성 정도를 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화 시킨 후, 잔가시 모자반 물 추출물을 각 농도별로 (0.1, 1, 10, 50 및 100 μg/mL) 첨가하고 생성된 NO를 측정하였다. LPS 처리 후 NO 생성량은 정상세포에

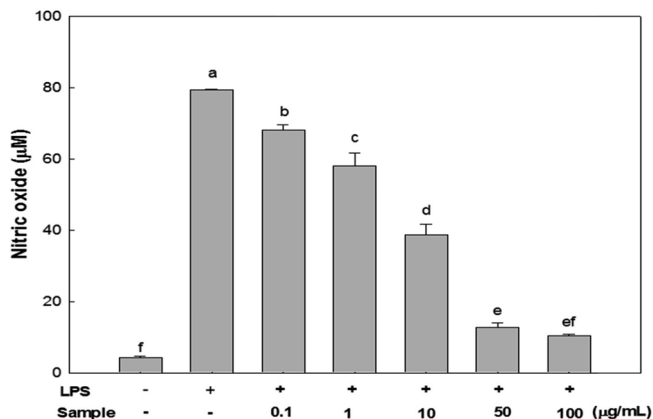


Fig. 2 Effect of *Sargassum micracanthum* water extract on production of nitric oxide in RAW 246.7 cells. ^{a-f}Means with different superscripts are significantly different (*p* < 0.05).

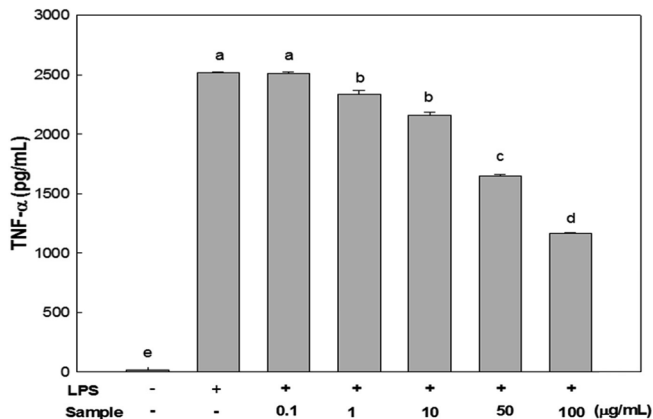


Fig. 4 Effect of *Sargassum micracanthum* water extract on production of TNF-α in RAW 246.7 cells. ^{a-e}Means with different superscripts are significantly different (*p* < 0.05).

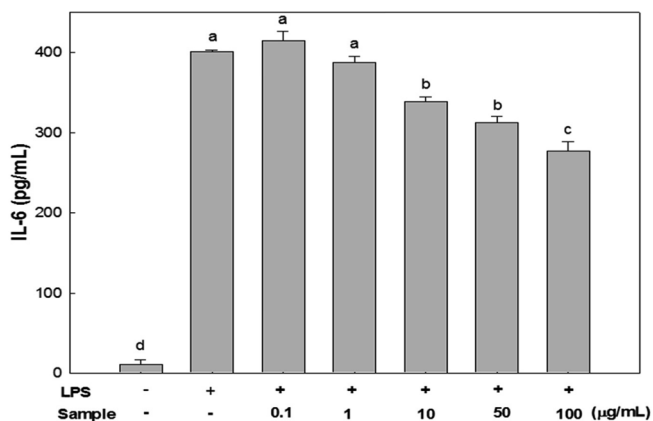


Fig. 3 Effect of *Sargassum micracanthum* water extract on production of IL-6 in RAW 246.7 cells. ^{a-d}Means with different superscripts are significantly different (*p* < 0.05).

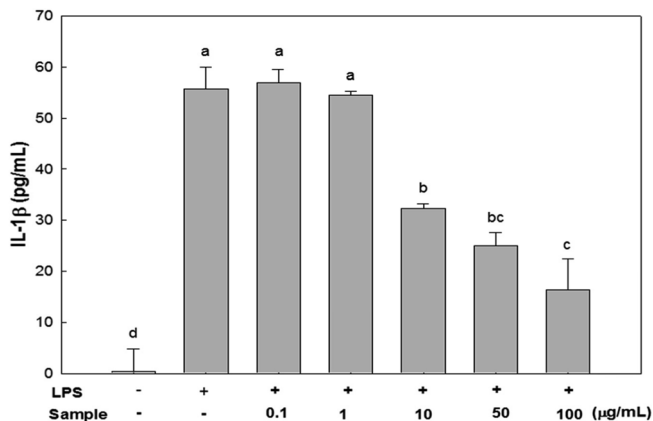


Fig. 5 Effect of *Sargassum micracanthum* water extract on production of IL-1β in RAW 246.7 cells. ^{a-d}Means with different superscripts are significantly different (*p* < 0.05).

비해 8배 이상 증가되었으며, 잔가지 모자반 물 추출물의 경우에는 50 µg/mL 농도에서 낮은 NO 분비량을 보였다(Fig. 2). 갈조류에 속하는 대표적인 생리활성 물질 중의 하나로 fucoidan 성분이 있으며, Kim 등(2008)은 갈조류 유래 fucoidan에 의한 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성과 iNOS 발현 억제 효과를 나타내었다. 또한 Yang 등(2013)은 갈조류인 경단구슬모자반 (*Sargassum muticum*)으로부터 추출된 apo-9-fucoanthinone이 NO, iNOS 및 COX-2 발현을 저해한다고 보고하였다. 이러한 연구결과들로 미루어 보아, 잔가지 모자반은 갈조류에 속하는 해조류로서 이로부터 유래되는 생리활성 성분들이 NO 생성 저해 효과에 탁월한 영향을 미친 것으로 사료된다.

염증 관련 cytokines 생성 억제 효과. IL-6는 체내에서 과잉 생산 될 경우 악성 종양이나 자가 면역질환 및 감염성 질환 등의 여러 가지 질환을 유발함에 따라 다양한 염증성 질환에서 IL-6 분비량이 항상 증가하는 것으로 보고되어 있으며 (Delgado 등, 2003; Chae 등, 2007), TNF-α는 여러 급성 또는 만성 염증 질환의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하게 되며, TNF-α의 합성 조절이 이들 질환의 치료에 이용될 수 있다 (Tracey 등, 1988; Beutler와 Cerami, 1989)고 알려져 있다. 마

지막으로 IL-1β는 염증 반응을 촉진하며 면역계를 자극하는 염증 유발 인자로 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙 등에 관련하며, 종양의 침습에도 관련이 있다고 알려져 있다(Delgado 등, 2003). 이러한 염증 관련 cytokine의 생성 억제에 잔가지 모자반 물 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해, RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후 추출물을 농도별로 처리하고 분비량을 측정하였다. 그 결과, IL-6 분비량에 있어서 잔가지 모자반 물 추출물의 농도에 따라 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 이는 모자반 추출물을 처리한 후 IL-6 분비량을 측정된 결과 50 µg/mL의 비교적 낮은 농도에서 50% 이상의 감소를 보인 결과(Kim, 2012)와 유사하다. 또한 TNF-α의 생성 억제에 있어서는 잔가지 모자반 물 추출물의 모든 처리구에서 그 분비량이 농도 의존적인 감소를 보였으며, 비교적 낮은 농도인 50 µg/mL에서 낮은 분비량을 보였다(Fig. 4). LPS 단독 처리 시 2517.94 pg/mL의 분비량에 비해 물 추출물은 1650.13±14.48 pg/mL으로 35% 이상의 높은 감소율을 나타냈다. 이러한 결과는 발효시킨 대황 물 추출물에서 농도 의존적으로 TNF-α 분비량이 감소한 항염증 억제 연구와 유사하다 (Kim 등, 2011a). IL-1β 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해

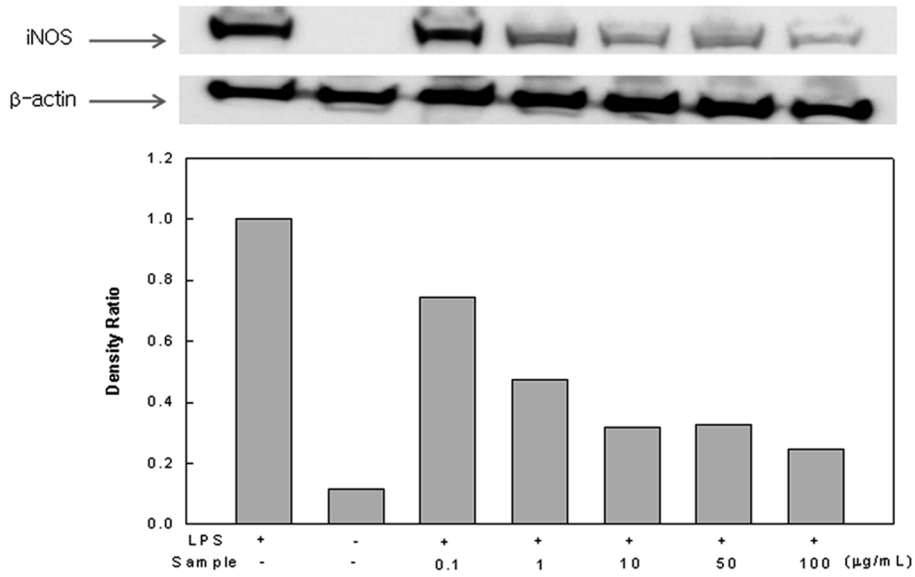


Fig. 6 Effect of *Sargassum micracanthum* water extract on LPS-induced iNOS expression in RAW 246.7 cells.

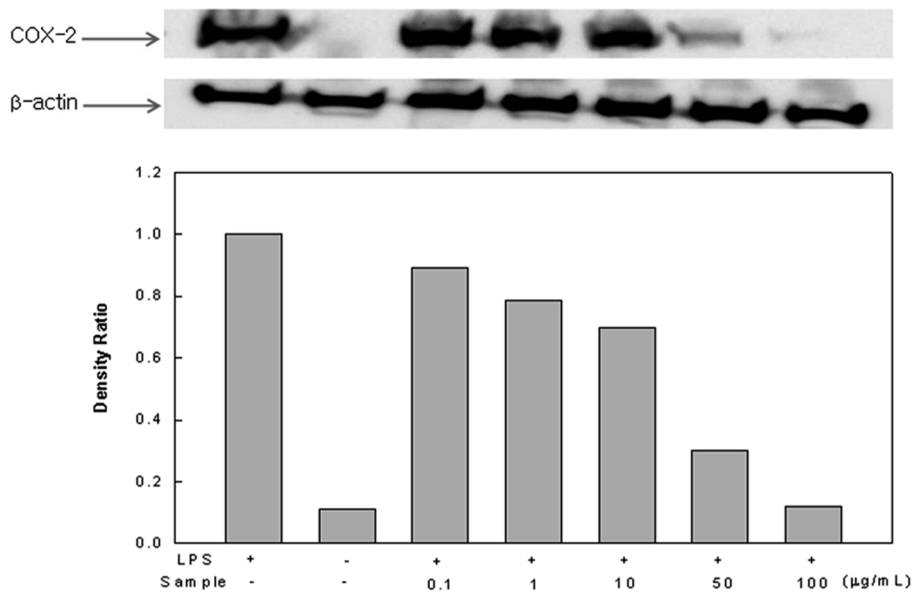


Fig. 7 Effect of *Sargassum micracanthum* water extract on LPS-induced COX-2 expression in RAW 246.7 cells.

LPS로 활성화 된 RAW 264.7 세포로부터 분비된 IL-1 β 분비량을 ELISA 방법으로 측정 한 결과, 추출물 처리 농도에 따라 그 분비량이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이는 급성기 염증 반응에서 혈액 내 TNF- α 및 IL-1 β 의 농도가 급격히 증가하며 IL-1 β 분비량이 TNF- α 분비와 상호작용을 나타낸다(Mathiak 등, 2000)는 보고에 따라, 잔가시 모자반 물 추출물 처리에 의한 TNF- α 분비량 감소와 비슷한 경향을 나타내는 것으로 보인다.

이러한 결과를 종합 해 볼 때, 잔가시 모자반 물 추출물은 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 분비량 감소에 있어서 효과적인 것으로 사료된다.

iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과. iNOS는 평소에는 세포 내

에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(Tezuka 등, 2001; Kim 등, 2002). COX는 cyclooxygenase와 peroxidase 활성을 모두 가지고 있는 효소이다. Cyclooxygenase 기능으로서 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변환하고, peroxidase 기능으로서는 endoperoxide를 prostaglandin으로 변환시키며, prostaglandin은 prostaglandins, thromboxane 및 prostacyclins의 전구체로 사용된다. COX-1은 모든 세포에 존재하면서 정상 세포의 항상성을 유지하지만 COX-2는 급성 염증 반응에서 prostaglandins의 합성에 관여하며 LPS 및 cytokine에 의해 발현이 유도된다

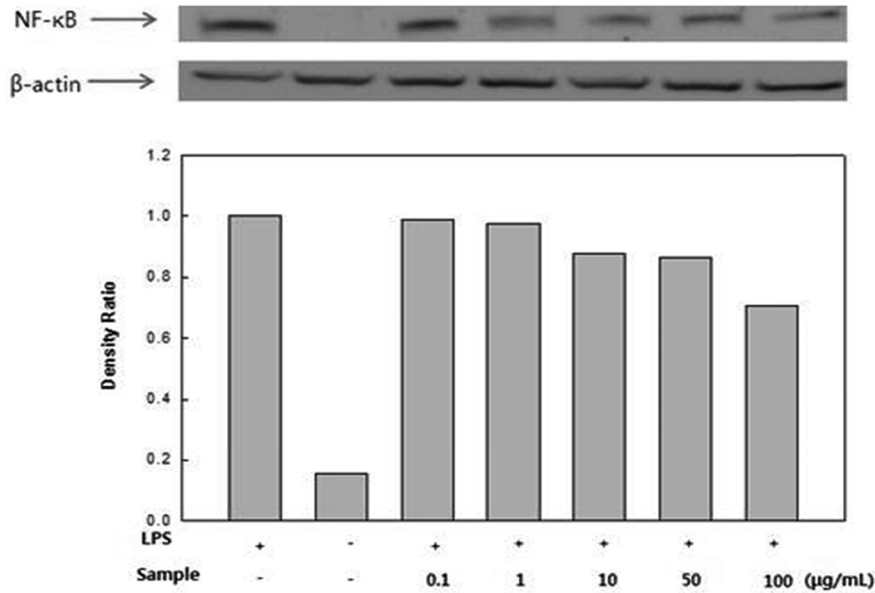


Fig. 8 Effect of *Sargassum micracanthum* water extract on LPS-induced NF-κB expression in RAW 246.7 cells.

(Hume 등, 2007; Lim과 Shin, 2010). 잔가시 모자반 물 추출물을 농도(0.1-100 μg/mL)에 따라 처리하고 iNOS 및 COX-2의 발현을 측정하였다(Fig. 6 and 7) 그 결과, 잔가시 물 추출물 처리구에서 농도 의존적인 발현저해 정도를 확인 하였으며, iNOS의 경우, 1 μg/mL의 낮은 농도에서도 LPS 단독 처리구와 비교하였을 때 50% 이상의 뛰어난 억제효과를 보였고, COX-2의 경우에는 100 μg/mL 농도로 물 추출물을 처리 시에 PBS 처리구와 비슷한 발현량을 보였다.

NF-κB p65 활성 억제 효과. NF-κB는 염증반응과 관련된 유전자의 promoter에 결합하여 그 유전자의 발현을 유도하며 cytokine 및 LPS 등에 대한 노출로 염증반응에 관여하는 COX-2 및 iNOS와 같은 물질의 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다(Celec, 2004; Marwaha 등, 2005). 따라서 잔가시 모자반 물 추출물이 NF-κB의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인한 결과, LPS 처리에 의해 NF-κB의 발현이 확연히 증가함을 알 수 있었다. 하지만 잔가시 모자반 물 추출물을 처리 하였을 경우, NF-κB 발현량이 현저히 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 8). 이는 잔가시 모자반 물 추출물이 NF-κB의 활성 억제를 통해 COX-2 및 iNOS 발현을 억제함으로써 PGE₂와 NO의 생성을 억제함에 따라 항염증 효과를 나타낸다고 생각된다(Kim 등, 2011b).

귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰. 염증은 인체의 손상 및 감염 등에 대한 일차적인 보호 작용으로서, 물리화학적 요인, 면역학적 요인 등에 의해 발생하며 발적, 발열, 부종, 통증을 동반한다. 염증이 유발되면 혈류량이 증가하여 열감과 발적이 나타나고, 혈액 내의 neutrophils 등이 혈관 밖 조직으로 부과되어 부종을 유발하며 염증 부위의 prostaglandin 증가 및 cytokine 활성화를 통해 통증이 유발된다(Ju 등, 2010). 잔가시 모자반 물 추출물의 효능을 확인하기 위해 10, 50 및 250 mg/kg 농도로 200 μL씩 경구투여 한 후, croton oil로 염증 유발하고 귀 두께를 측정하였다(Fig. 9). Control과 비교하여 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소한 것을 확인하였으며, 이는 현지초의 진통 및 항염증 효과에 관한 연구(Ju 등, 2010)

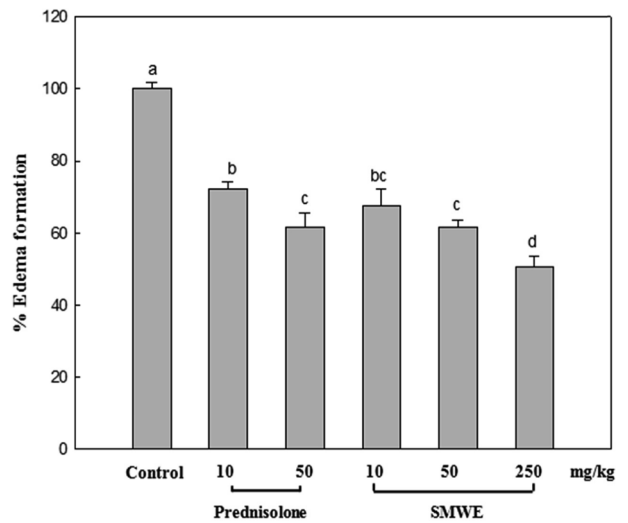


Fig. 9 Inhibition of *Sargassum micracanthum* water extract against croton oil-induced mouse ear edema. ^{a-d}Means with different superscripts are significantly different (p <0.05).

와 유사하다. 특히, 250 mg/kg 농도에서 positive control인 prednisolone 처리구와 비교하였을 때, prednisolone 50 mg/kg 처리보다 현저히 감소함을 확인하였다. 이는 조직 관찰 결과에서도 일치하는 경향을 나타내었다(Fig. 10). 통증 및 염증을 완화에는 비스테로이드계 소염진통제가 주로 사용되지만 부작용(Sánchez-Borges, 2010)이 보고된 바 있다. 따라서 현재 천연물로부터의 새로운 진통 및 항염증제의 가능성을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며 본 연구의 귀 부종 억제 실험 결과로 미루어 볼 때, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물은 부종 완화에 뛰어난 효과가 있으며 이를 이용한 치료제 개발에도 가능성이 있을 것으로 사료된다.

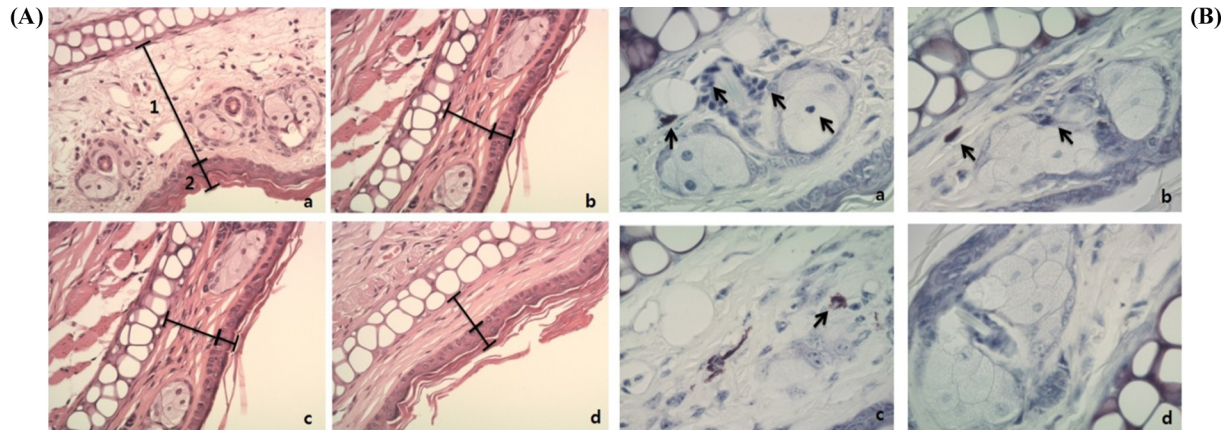


Fig. 10 Photomicrographs of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of croton oil 5% (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) and examined under light microscopy (magnification: 200×). Treatments: vehicle 2% tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b), and *Sargassum micracanthum* water extract 20 μL/ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively.

Table 1 Mortality of mice treated orally with *Sargassum micracanthum* water extract

	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. 본 연구에서는 해양 식물 자원인 잔가지 모자반의 물 추출물의 독성을 평가하기 위해 300, 2,000 및 5,000 mg/kg 농도로 200 μL씩 경구투여하고 2주간 행동변화 및 치사율을 관찰하였다(Table 1). 경구투여 후 4시간까지 행동 변화를 관찰하였을 때, 모든 농도에서 이상 행동은 관찰되지 않았다. 또한 물 추출물을 투여한 후 2주 동안 이를 간격으로 관찰한 결과, 그 치사율은 0%로 나타났다. 이러한 결과를 종합 해 볼 때, 잔가지 모자반 물 추출물은 5,000 mg/kg 농도에서도 인체에도 무해하며 안전한 소재로서 식재료 또는 건강 기능 식품의 원료로서도 사용이 가능하다고 볼 수 있을 것이다. 또한 기존의 밝혀진 잔가지 모자반의 생리활성과 함께 항염증 기능성 식품 소재로 무한한 이용과 가공이 가능할 것으로 사료된다.

초 록

본 연구에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 염증반응을 통해 잔가지 모자반 (*S. micracanthum*) 물 추출물의 항염증 활성을 알아보았다. 잔가지 모자반 물 추출물이 대식세포에 미치는 독성을 알아보기 위해 MTT assay를 시행했으며, NO 생성량을 비롯하여 TNF-α, IL-6 및 IL-1β와 같은 염증 매개성 사이토카인 분비량을 측정하기 위해 ELISA법을 사용하였다. 또한, immunoblotting을 통해 iNOS, COX-2 및 NF-κB p65 단백질 발현량을 알아보았다. 실험결과, 잔가지 모자반 물 추출물이 대식세포에 미치는 독성은 보이지 않았으며, NO 및 염증 매개성 사이토카인의 분비량이 농도 의존적으로 억제됨

을 보였다. 특히, IL-1β 분비량이 50 μg/mL에서 50% 이상 저해됨을 보였다. 또한, iNOS, COX-2 및 NF-κB p65 단백질 발현량에서도 농도의존적인 감소를 보였다. 모자반 물 추출물을 5,000 mg/kg body weight까지 경구투여 한 후 2주 동안 관찰한 결과 경구독성을 보이지 않음을 확인하였다. 그 후, 동물 실험을 통해 염증으로 인한 귀 부종의 두께를 측정하고, 가장 높은 처리 농도인 250 mg/kg body weight으로 경구투여 하였을 때 prednisolone을 투여한 대조군과 유의적으로 비슷한 수준까지 귀 부종이 완화됨을 보였다. 따라서 본 연구는 잔가지 모자반 물 추출물이 뛰어난 항염증 효과를 가지고 있음을 나타내며, 향후 염증질환 치료제 개발에 잔가지 모자반 물 추출물이 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Keywords 귀 부종 · 잔가지 모자반 · 항염증 · NF-κB

감사의 글 이 논문은 2013년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2012R1A6A1028677).

References

Baek YM, Choi JY, Lee CW, Jeon YS, Han JT, Jang SI et al. (2012) Effects of *Chinemys reevesii* on lipopolysaccharide-induced inflammatory reactions. *Korean J Orinet Physiol Pathol* **26**, 26–34.
 Beutler B and Cerami A (1989) The biology of cachectin/TNF-α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* **7**, 625–55.
 Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, and Mitchell JA (2002) Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **21**, 93–101.

- Celec P (2004) Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine: the next generation. *Biomed Pharmacother* **58**, 365–71.
- Chae SY, Kim MJ, Kim DS, Park JE, Jo SK, and Yee ST (2007) Effect of *Asterina pectinifera* extraction on the activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **36**, 269–375.
- Cho EK and Choi YJ (2010) Physiological activities of hot water extracts from *Ecklonia cava* Kjellman. *J Life Sci* **20**, 1675–82.
- Delgado AV, McManus AT, and Chambers JP (2003) Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2 and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuro* **37**, 355–61.
- Ghosh S and Hayden HS (2008) New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol*. **8**, 837–48.
- Ham YM, Kim KN, Lee WJ, Lee NH, and Hyun CG (2010) Chemical constituents from *Sargassum micracanthum* and antioxidant activity. *Int J Pharmacol* **6**, 147–51.
- Heinzemann A and Daser A (2002) Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int Arch Allergy Immunol* **127**, 170–80.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, and Osawa T (1990) Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* **144**, 1425–31.
- Hume DA, Wells CA, and Ravasi T (2007) Transcriptional regulatory networks in macrophages. *Novartis Found Symp* **281**, 2–18.
- Imm JY and Kim SJ (2010) Anti-cancer and anti-inflammatory effects of mung bean and soybean extracts. *Korean J Food Sci Technol* **42**, 755–61.
- Ju MS, Jeong HU, Kim HG, Park GH, Youn YS, Kim YO et al. (2010) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Geranii herba*. *Korea J Herbol* **25**, 97–101.
- Kim BH, Oh JM, Kang KW, Kwak SH, Yun SY, Lee CH et al. (2008) Evaluation of oxy-radical scavenging capacity of fucoidan. *J Environ Toxicol* **23**, 41–5.
- Kim C, Lee IK, Cho GY, Oh KH, Lim YW, and Yun BS (2012a) Sargassumol, a novel antioxidant from the brown alga *Sargassum micracanthum*. *J Antibiot* **65**, 87–9.
- Kim DH, Hwang EY, and Son JH (2013) Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorious* seed extracts in RAW 264.7 cells. *J Life Sci* **23**, 55–62.
- Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, and Byun SH (2009) Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyeonhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. *Kor J Herbol* **24**, 39–47.
- Kim JY, Jung KS, and Jeong HG (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* **569**, 321–6.
- Kim MJ (2012) Anti-inflammatory activity of the *Sargassum fulvellum* and *Sargassum sagamianum* ethanol extracts. MS Thesis, Pukyong national university, Korea.
- Kim NY, Kim HJ, Lee JH, Lee EK, Kang OH, So HS et al. (2011a) Comparison of anti-inflammatory effects of water fermented and ethanol fermented extracts from *Rhei Radix et Rhizoma*. *Korean J Oreint Physiol Pathol* **25**, 227–33.
- Kim RG, Shin KM, Chun SK, Ji SY, Seo SH, Park HJ et al. (2002) *In vitro* anti-inflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* **46**, 343–7.
- Kim S, Jung E, Shin S, Kim M, Kim YS, Lee J et al. (2011b) Anti-inflammatory activity of *Camellia japonica* oil. *BMB Rep* **45**, 177–82.
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, and Jeong JH (2012b) Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 1205–10.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- Lee ES, Ku HK, Moon TC, Lee E, Ahng Y, Lee SH et al. (2004) Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)-kappa B activation in cultured murine macrophages. *Bio Pharm Bull* **27**, 617–20.
- Lee HN, Kim JK, Kwon GT, Shim JH, Kim JD, and Yoon JH (2012a) Anti-inflammatory effects of ethanol extract from Bark of *Acer barbinerve* Maxim. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 1242–7.
- Lee KH, Nam HO, and Yoon WH (2007) Effect of protein-bound polysaccharide isolated from *Acanthopanax senthapanax* in reducing the toxic effect of cisplatin. *Korean J Pharmacogn* **38**, 1–17.
- Lee SE, Lee H, Kim K, Kim GS, Kim YO, Soe S et al. (2011) Anti-inflammatory activity of medicinal plant extracts. *Korean J Medicinal Crop Sci* **19**, 217–26.
- Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, and Byun MW (2000) Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **29**, 342–8.
- Lee YJ, Yoon BR, Choi HS, Lee BY, and Lee OH (2012b) Effect of *Sargassum micracanthum* extract on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J Food Preserv* **19**, 455–61.
- Lim H and Shin S (2010) Effects of the essential oil components from *Ligusticum chuanxiong* on proinflammatory mediators of RAW 264.7 macrophage cells. *Nat Prod Sci* **16**, 259–64.
- Majdalawieh A and Ro HS (2010) Regulation of I κ B α function and NF- κ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediatr Inflamm* **2010**, 1–27.
- Marwaha V, YH Chen, E Helms, S Arad, H Inoue, E Bord et al. (2005) T-oligo treatment decreases constitutive and UVB-induced COX-2 promoter. *J Biol Chem* **280**, 32379–88.
- Mathiak G, Grass G, Herzmann T, and Luebke T (2000) Caspase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS-lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. *Br J Pharmacol* **131**, 383–6.
- McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, and Corbett JA (1996) Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* **211**, 24–32.
- Sánchez-Borges M (2010) NSAID hypersensitivity (respiratory, cutaneous, and generalized anaphylactic symptoms). *Med Clin North Am* **94**, 853–64.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W et al. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12013–7.
- Smith WL, DeWitt DL, and Garavito RM (2000) Cyclooxygenase: structures, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145–82.
- Sung YY, Kim DS, Yang WK, Nho KJ, Seo HS, Kim YS et al. (2012) Inhibitory effects of *Drynaria fortunei* extracts on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol* **144**, 94–100.
- Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota A, Nagaoka T, Xiong Q et al. (2001) Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *J Ethnopharmacol* **77**, 209–17.
- Towbin HT, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350–4.
- Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, and Nguyen HT (1988) Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* **167**, 1211–27.
- Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T, and Huez G (1996) Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharide in macrophages: similarities and differences. *J Inflamm* **46**, 1–12.
- Yang EJ, Ham YM, Lee WJ, Lee NH, and Hyun CG (2013) Anti-inflammatory effects of apo-9-fucocyanthine from the brown alga, *Sargassum muticum*. *J Pharm Sci* **21**, 1–7.
- Yun YG, Kim GM, Lee SJ, Ryu SH, and Jang SI (2007) Inhibitory effect of aqueous extract from *Lonicera japonica* flower on LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages. *Kor J Herbol* **22**, 117–25.