

우렁쉥이(*Halocynthia roretzi*) 껍질로부터 분리된 다당류의 면역증강 효과

이대훈 · 홍주헌

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Immune-Enhancing Effects of Polysaccharides Isolated from Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic

Dae-Hoon Lee and Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

ABSTRACT In this study, the immune-enhancing effects of purified polysaccharides from ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic were investigated. Crude polysaccharides (AP) were isolated by enzyme extraction (neutrane, 60°C, 15 h), ethanol precipitation, and lyophilization. In addition, crude polysaccharides were further fractionated into unabsorbed fractions (APF-I, fraction No. 11~17) and absorbed fractions (APF-II, fraction No. 22~37) by DEAE-sepharose CL-6B column chromatography in order to isolate immune regulating polysaccharide. The major constituents in APF-I and APF-II were total sugar (66.62% and 27.03%), uronic acid (47.53% and 15.87%), hexosamine (16.62% and 46.79%), and protein (2.43% and 4.94%), respectively. APF-I increased production of nitric oxide (NO) and cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-6 in a dose-dependent manner. The mRNA expression levels of inducible NO synthetase, cyclooxygenase-2, TNF- α , and IL-6 were markedly increased as determined by polymerase chain reaction analysis. The above data led us to conclude that macrophage activation of purified polysaccharides was higher than that of crude polysaccharides. The polysaccharides isolated from ascidian tunic investigated herein are useful as natural immune enhancing agents.

Key words: ascidian tunic, polysaccharide, immune enhancing, nitric oxide, cytokine production

서 론

20세기 후반에 이르러 현대의 약으로 치료가 어려운 만성 대사성 질환이 급증하고 있으며, 특히 체질성(constitutional) 질환이나 심인성(psychosomatic) 질환의 급증 및 합성 의약품의 심각한 부작용이 알려지면서 기존의 의약품을 대체할 새로운 수단이 요구되고 있다. 특히 전 세계적으로 사망률이 가장 높은 질병인 암의 경우 암 발생 시 면역계에서 암세포를 억제시키는 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며, 암 발생 억제 차원에서 면역계를 활성화시켜 줄 수 있는 다양한 후보 물질 탐색에 대한 노력이 필요하다(1,2). 최근에는 생물자원의 생리활성 성분에 대한 관심이 높아지고 있으며, 항생물질에 의한 치료의 가장 유망한 대체 수단으로 인체가 갖는 고유 방어기구인 면역계의 활성화를 유도하는 면역 증강제의 이용이 제안되고 있다(3). 면역계는 외부 위해 항원들의 침입이나 조직 손상을 야기하는 물질들이 신체에 침입하였을 때 이들로부터 신체를 보호하는 자기

방어 수단으로써 작용하고 림프구를 포함한 여러 가지 면역 세포들에 의하여 다양한 면역반응들이 일어난다(4-6). 대식 세포 활성화 지표 중의 하나인 nitric oxide(NO)는 cytokine이나 미생물의 영향을 받아 대식세포에서 생성되는 반응물질로 중간체로서 nitric oxide synthase(NOS)와 산소가 결합하여 L-arginine을 산화시켜 NO가 생성된다. 생성된 NO는 세포 내 감염을 일으키는 미생물과 암세포를 제어하는 것으로 보고되고 있고, NO가 필요 이상 생성되면 혈관 확장, 염증반응에 의한 조직 손상, 돌연변이 등을 일으켜 생체 내 유해 작용을 나타내는 것으로도 알려져 있다(7,8). 이와 같이 NO는 이중적 특성을 나타내어 약물 처리 시 세포독성을 유발하지 않는 농도에서 NO 생성을 촉진하면 면역기능을 증가시키는 것으로 판단할 수 있다(9).

일반적으로 다당류는 각각 고유의 기능을 갖고 있지만 대체로 미용이나 관절염, 혈류 개선, 눈의 피로 완화, 면역력 강화 및 자양강장에 대한 효과와 관계가 있다고 알려져 있으며, 천연물 소재를 기반으로 하는 건강기능식품 및 기능성화장품 등에 대한 일반인들의 인식이 높아지고 있다(10). 우렁쉥이(*Halocynthia roretzi*)는 세계적으로 약 2,000여 종이 알려져 있고, 계통 분류학상 척추동물과 무척추 동물의 중간 위치인 원색동물의 미색류에 속하며, 최근 동해안과 남해안을 중심으로 우렁쉥이의 양식기술이 보급되어 그 생산량이

Received 29 January 2015; Accepted 2 March 2015

Corresponding author: Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-702, Korea
E-mail: jhhong@cu.ac.kr, Phone: +82-53-850-3218

증가 추세에 있다(11). 하지만 우렁쟁이는 생식 이외에 특별한 가공법이 개발되어 있지 않기 때문에 생식 및 가공처리 시 가식 부위를 제외한 껍질 부분이 대량 폐기되고 있으며, 이 폐기물은 쉽게 분해되지 않아 해역의 오염 등 현재 가장 이용률이 낮은 폐기물로 인식되고 있는 실정이다(12). 우렁쟁이 껍질에는 여러 종류의 황산다당이 존재하고 종에 따라 그 함량 및 화학적 특성에 차이가 있다고 보고되어 있으며(13), 관련 연구로는 껍질성분 및 색소를 이용한 양식소재 개발 연구(14), 황산다당의 화학적 특성 및 기능적 특성 연구(15), glycosaminoglycans의 특성(16) 및 조다당의 면역활성(17) 등이 진행되어 왔다.

따라서 본 연구에서는 우렁쟁이 껍질로부터 조다당류를 추출하였고 분리 및 정제를 통해 얻어진 분획물의 면역증강 효과를 확인하기 위해 NO 및 이와 관련된 cytokine들인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin(IL)-6의 생성량과 유전자 발현 정도를 분석하였고 면역증진 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 우렁쟁이 껍질은 국내산으로 경상남도 통영시 소재 수산물 공판장에서 제공받아 실험에 사용하였다. 이물질 제거하고 육과 분리한 우렁쟁이 껍질을 수회 수세 후 50°C에서 열풍 건조(OF-22, JEIO TEC, Daejeon, Korea)한 다음 분쇄기(J-NCM, Jisico, Seoul, Korea)로 분쇄하여 60 mesh 표준망체(Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 통과한 분말을 -20°C 이하의 암소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

조다당류의 추출

우렁쟁이 껍질 유래 조다당류의 추출은 열풍 건조된 우렁쟁이 껍질 분말 10 g에 증류수를 고형분 대비 20배 첨가하고, 기질에 대하여 단백질 농도비가 1/50이 되도록 neutralase(Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)를 첨가하여 shaking incubator(BS-31, JEIO TEC)로 60°C, 150 rpm에서 15시간 동안 교반 추출하였다. 추출물은 원심분리(3,000×g, 20분, VS-6000CFN, Vision Scientific Co., Ltd., Bucheon, Korea) 하여 회수한 상등액에 최종 농도가 3% 되도록 trichloroacetic acid(TCA, Acros organics, Geel, Belgium)를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후, 원심분리(3,000×g, 20분) 하여 침전된 단백질을 제거하였다. 단백질을 제거한 상등액을 감압 농축(Model N-1N, Eyela Co., Tokyo, Japan)한 다음, 농축액 대비 5배량의 ethanol을 첨가하여 24시간 교반하고 원심분리(3,000×g, 20분) 하여 조다당류를 회수하였고, 동결건조기(Free Zone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA)로 건조하여 -70°C 이하의 암소에 보관하면서 분리 및 정제용 시료로 사용하였다.

다당류의 분리 및 정제

다당류의 분리 및 정제를 위하여 조다당류를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 용해(50 mg/mL) 및 원심분리(3,000×g, 20분, VS-6000CFN, Vision Scientific Co.) 하여 불용성 물질을 제거한 후 DEAE-sepharose CL-6B(Amersham Bio-sciences Co., Piscataway, NJ, USA)를 충전제로 이용하여 column(2.5×30 cm)에 충전시키고, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 평형화한 후 0~1 M NaCl로 농도구배를 주어 유속 1 mL/min으로 10 mL씩 분취하여 총당의 경우 phenol-sulfuric acid 방법(18)으로, uronic acid의 경우 Cesaretti 등(19)의 방법으로 측정된 후 용출 양상에 따라 희분을 수집하고 증류수로 투석 및 농축한 다음 동결 건조하여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

다당류의 수율

우렁쟁이 껍질로부터 추출한 조다당류와 조다당류에서 분리 정제한 다당류의 수율은 동결 건조(FreeZone 2.5, Labconco Co.)한 다음 건물 중량을 구하였고 시료 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다.

총당 및 uronic acid 함량

총당 함량은 5% phenol(w/v, Duksan Pure Chemical Co., Seoul, Korea) 1 mL와 sulfuric acid(Duksan Pure Chemical Co.) 5 mL를 시료 1 mL와 반응시킨 후 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 사용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, glucose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다.

Uronic acid 함량은 25 mM sodium tetraborate(Sigma-Aldrich Co.)를 진한 황산 용액으로 제조한 후 이 용액 0.2 mL와 시료 0.05 mL를 96-well plate에 넣고 잘 섞은 후 100°C에서 10분간 가열하였다. 그다음 상온에서 15분간 냉각 후 0.125% carbazole(w/v, Sigma-Aldrich Co.) 0.05 mL를 가하고 다시 100°C에서 10분간 가열하였으며 상온에서 15분 방냉한 후 microplate reader(UVM-340, ASYS Co., Eugendorf, Austria)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, galacturonic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다.

총 단백질 및 hexosamine 함량

총 단백질 함량은 Lowry 등(20)의 방법으로 측정하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다.

Hexosamine 함량은 Blix(21)의 방법에 준하여 시료 100 μ L를 1 M hydrochloric acid(HCl, Duksan Pure Chemical Co.) 용액으로 가수분해 하였고 2.5% sodium nitrite(w/v, Sigma-Aldrich Co.) 0.4 mL를 넣은 후 15분간 반응한 다음

12.5% ammonium sulfamate(w/v, Sigma-Aldrich Co.)를 0.2 mL 넣고 5분 반응시켰다. 여기에 0.2 mL 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate(MBTH, Sigma-Aldrich Co.)를 넣고 37°C에서 30분 반응한 후 0.5% ferric chloride(w/v Duksan Pure Chemical Co.) 0.2 mL를 넣고 5분간 방치한 다음 650 nm에서 흡광도를 측정하였으며, N-acetyl-glucosamine(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 계산하였다.

세포 배양

실험에 사용한 대식세포주인 RAW 264.7(KCTC No. 40071) 세포는 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 DMEM 배지(Welgene, Daegu, Korea)를 이용하여 각각 10% fetal bovine serum (Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA), 1% penicillin-streptomycin(Gibco BRL Co.)을 첨가하여 배양하였다. 세포는 모두 37°C, 5%로 조절된 CO₂ incubator(MCO-18 AIC, SANYO Co., Sakata, Japan)에서 배양하였다.

세포독성

세포독성은 MTT assay로 측정하였으며, 배양된 세포주를 5×10⁴ cell/well의 농도로 조정하여 96-well plate에 100 µL씩 첨가하여 24시간 배양하고 이후 새로운 배지에 시료를 농도별로 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 methyl thiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT 5 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 각 well에 10 µL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 이후 상등액을 완전히 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 100 µL를 각 well에 첨가하여 10분간 반응시켜 formazan 결정을 완전히 용해한 다음 microplate reader(UVM-340, ASYS Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 5×10⁴ cell/well이 되도록 96-well plate에 각각 100 µL씩 첨가하여 24시간 배양하고, 농도별 시료 및 lipopolysaccharide(LPS 0.1 µg/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 완료된 후 상등액 50 µL에 동량의 Griess 시약(Sigma-Aldrich Co.)을 혼합하여 10분간 반응시킨 후 microplate reader(UVM-340, ASYS Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, NO 생성량은 sodium nitrite(Sigma-Aldrich Co.)의 농도별 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

Cytokine 생성량 측정

우렁쟁이 껍질에서 추출 분리된 조다당류 및 다당류 정제

물은 농도별로 RAW 264.7 세포를 5×10⁵ cell/well이 되도록 배양된 24-well plate에 처리하여 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양 상등액을 이용하여 TNF-α 및 IL-6의 양을 ELISA kit(Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ, USA)으로 제조사의 지침에 따라 측정하였다. TNF-α 및 IL-6의 함량은 kit에 포함된 TNF-α 및 IL-6로 작성한 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

RT-PCR

RAW 264.7 세포를 1.5×10⁶ cell/well이 되도록 배양된 6-well plate에 시료 및 LPS(0.1 µg/mL)를 처리하고 6시간 배양하였다. 배양된 세포를 모아 원심분리(1,000×g, 3분, Gyro 1236 MG, Gyrozen, Daejeon, Korea) 하여 상등액을 제거하고, PBS로 cell을 세척한 후 pellet을 얻어 Rneasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 얻어진 RNA(1 µg)를 Revertaid first strand cDNA synthesis kit(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)으로 cDNA를 합성하여 RT-PCR(Mastercycler® nexus, Eppendorf, Hamburg, Germany)을 수행하였다. 사용된 primers sequence는 Table 1과 같으며, PCR 조건은 94°C-30초(denaturation), 55°C-30초(annealing), 72°C-1분(extension)으로 28회 증폭 후 72°C(re-extension)로 PCR 산물을 획득하였고, Eco view(Dae Myung Science Co., Ltd., Seoul, Korea)를 포함한 1% agarose gel 상에서 전기영동(Mupid-ex, Advance, Tokyo, Japan) 한 다음, 밴드의 강도를 Image J(National Institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

통계처리

실험 결과는 3회 반복 실험한 다음 평균±표준편차로 나타내었으며 SPSS(19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고 각 측정 평균값의 유의성(P<0.05)은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer sequence	Size (bp)
iNOS	F: 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' R: 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	496
COX-2	F: 5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3' R: 5'-ATGCTCCTGCTTGTAGTATGT-3'	696
TNF-α	F: 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3' R: 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	364
IL-6	F: 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3' R: 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	308
β-Actin	F: 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3' R: 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	603

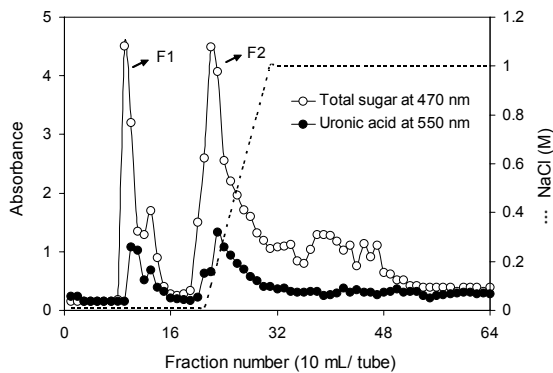


Fig. 1. Chromatogram of polysaccharide from ascidian tunic on DEAE-sepharose CL-6B. The constituents were eluted with linear gradient between 0~1 M NaCl containing 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 6.0). Total sugar and uronic acid were assayed by the phenol-sulfuric method and carbazole reaction, respectively.

결과 및 고찰

정제 다당류의 이화학적 특성

우렁쉥이 껍질로부터 분리한 조다당류(AP)를 DEAE-sepharose CL-6B를 이용하여 염 농도를 0~1.0 M로 증가시키면서 정제하였으며, 증류수로 용출되는 비흡착 획분(APF-I, fraction No. 11~17)과 흡착된 후 NaCl 용액에 의해 용출된 획분(APF-II, fraction No. 22~37)의 총당 및 uronic acid 함량 분석 결과는 Fig. 1과 같다. Pavão 등(22)은 우렁쉥이로부터 분리된 조다당을 DEAE-cellulose를 이용하여 염의 농도 증가(0~1.0 M NaCl)를 통해 2개의 획분으로 분리하였으며, Baginski 등(23)은 우렁쉥이로부터 Bio-Gel P-2를 이용하여 glycan을 정제한 결과 2개의 획분으로 분리하였고 구성성분은 차이가 있음을 보고하였다. 일반적으로 열수 추출물로부터 에탄올 침전에 의해 획분된 다당은 주로 다당류 또는 단백질다당의 고분자물질로 구성되어 있으므로(24), 구성성분으로서 총당, uronic acid, hexosamine 및 총단백질 함량을 측정하였으며 조다당류 및 다당류 정제물의 수율 및 이화학적 특성을 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 우렁쉥이 껍질로부터 추출된 조다당류의 수율은 10.27%였고 조다당류로부터 분리 정제된 분획물은

각각 7.91%(APF-I) 및 19.43%(APF-II)였다. 총당 함량은 APF-I에서 66.62%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, AP 및 APF-II에서 각각 27.53% 및 27.03%의 함량을 나타내어 APF-I이 AP에 비해 2배 이상 높은 함량을 보여주었다. Uronic acid 함량은 APF-I에서 47.53%로 가장 높았으며 APF-II 및 AP에서 각각 15.87% 및 8.75%로 분석되어 APF-I 구간이 가장 높게 나타났다. 이는 Koo 등(25)의 톱과 모자반 fucoidan의 크로마토그래피 획분에서 염 농도가 증가할수록 uronic acid 함량이 6.02%에서 3.26%로 낮은 획분을 수집하였다는 연구 결과와 일치하는 경향을 나타내었으며, uronic acid 함량이 높은 다당류는 면역 활성 및 항보체 활성 등을 갖는 것으로 알려져 있다(26). Hexosamine은 AP에서 21.40%의 함량을 나타내었으며 정제 후 APF-I 및 APF-II에서 각각 16.62% 및 46.79%로 나타나 APF-II의 함량이 높았는데, 이는 Albano와 Mourão(27)의 오만등이 껍질에서 크로마토그래피한 다당 획분의 hexosamine 함량 분석 결과, 염 농도가 증가할수록 2.4~2.8%에서 14.8~27.0%로 증가하였다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 총단백질 함량은 AP에서 33.19% 함유하고 있었으나, 정제 후 각각 2.43% 및 4.94%로 감소함을 확인하였다.

세포 독성 및 NO 생성량

우렁쉥이 껍질 유래 조다당류 및 조다당류로부터 분리 정제된 분획물을 RAW 264.7 세포에 농도별로 처리하여 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 조다당류는 5~100 µg/mL 농도에서, 분리 정제된 다당류는 0.5~10 µg/mL 농도로 처리하였을 때 각각 100 µg/mL 및 5 µg/mL 이하 농도까지 유의적인 세포사멸이 나타나지 않아 세포독성이 없음을 확인하여 면역증강 세포실험의 농도로 설정하였다.

NO는 면역계에서 외부 물질에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호전달 물질로 NOS의 작용에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 생성되며, 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환기계에서는 혈관 이완 물질로, 중추신경계에서는 신경 전달 물질로, 면역계에서는 방어 물질로 알려져 있다(28). 본 연구에서는 RAW 264.7 세포에 AP, APF-I 및 APF-II를 처리한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 대조군에 비하여 APF-I 및 APF-II 1 µg/mL의 농

Table 2. The chemical properties of polysaccharide fractions from ascidian tunic

Samples ¹⁾	Yield (dry basis, %)	Total sugar (glucose, %)	Uronic acid content (GA ²⁾ , %)	Hexosamine content (NAG ²⁾ , %)	Total protein (BSA ³⁾ , %)
AP	10.27±0.42	27.53±0.31 ^{b4)}	8.75±1.69 ^c	21.40±0.16 ^b	33.19±0.38 ^a
APF-I	7.91±0.35	66.62±3.87 ^a	47.53±2.75 ^a	16.62±1.21 ^c	2.43±0.13 ^c
APF-II	19.43±0.11	27.03±1.54 ^b	15.87±1.41 ^b	46.79±0.80 ^a	4.94±0.31 ^b

¹⁾ AP, crude polysaccharide from ascidian tunic; APF-I, polysaccharide fraction-I from ascidian tunic; APF-II, polysaccharide fraction-II from ascidian tunic.

²⁾ Uronic acid content was determined by the carbazole reaction (19), using GA, galacturonic acid as a standard; hexosamine content was determined by Blix method (21), using NAG, N-acetyl-glucosamine.

³⁾ BSA, bovine serum albumin.

⁴⁾ Means±SD (n=3) within each column (a-c) followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

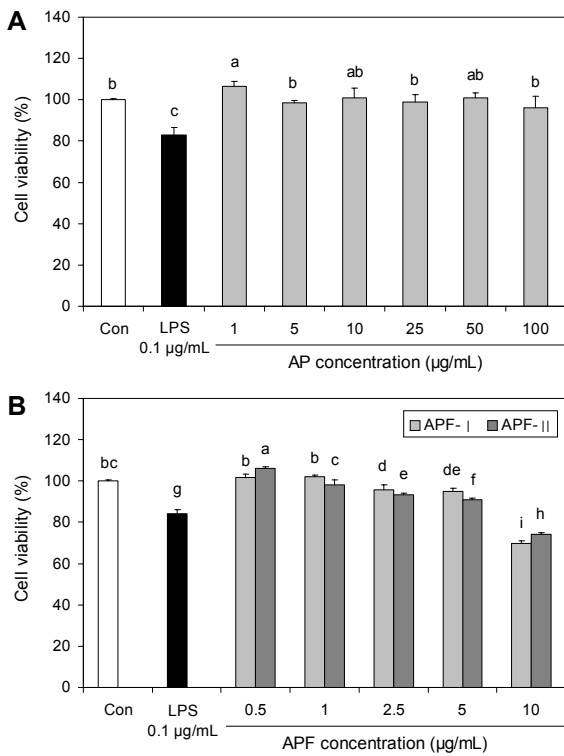


Fig. 2. Effect of crude polysaccharide (A) and polysaccharide fraction (B) from ascidian tunic on the cell viability of RAW 264.7 cell. Means±SD (n=3) with different letters above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$). LPS, lipopolysaccharide; AP, crude polysaccharide from ascidian tunic; APF- I, polysaccharide fraction- I from ascidian tunic; APF- II, polysaccharide fraction- II from ascidian tunic.

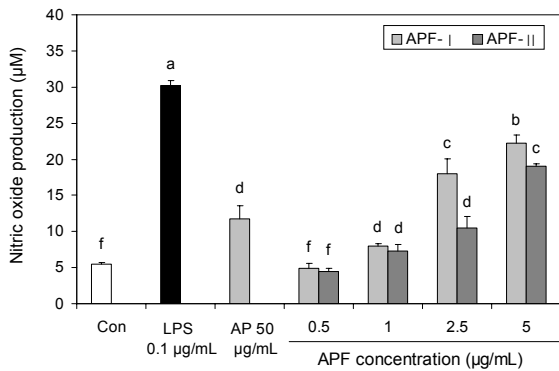


Fig. 3. Effect of polysaccharide fractions from ascidian tunic on the nitric oxide production by RAW 264.7 cell. Means±SD (n=3) with different letters above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$). LPS, lipopolysaccharide; AP, crude polysaccharide from ascidian tunic; APF- I, polysaccharide fraction- I from ascidian tunic; APF- II, polysaccharide fraction- II from ascidian tunic.

도에서 각각 7.96 및 7.33 μM 로 유의적으로 NO 생성량이 증가하였으며, APF- I 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 22.23 μM 의 함량을 나타내어 LPS(0.1 $\mu\text{g/mL}$) 대비 73.48%로 타 구간에 비해 가장 높은 생성량을 나타내었다. 이는 AP 50 $\mu\text{g/mL}$ (11.76 μM)와 비교 시 정제를 통해 1/10의 저농도에서 NO

생성량이 크게 증가함을 확인하였다. Jung 등(29)의 함초 조다당 추출물을 대식세포에 농도별로 처리한 결과 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 3.19 μM 을 생성하여 본 연구 결과에서 우수한 NO 생성량을 나타냄을 확인하였으며, Park 등(17)의 우렁쟁이 껍질 조다당 추출물의 면역 활성 연구에서 대식세포에 시료를 처리한 결과 농도가 증가함에 따라 NO 생성량이 증가하였다는 결과와 유사한 경향을 보였다. 생체는 외부로부터 이물질이 침입하게 되면 자기방어를 위해 대식세포가 활성화되어 탐식작용 및 다양한 면역증강물질을 생성하게 되는데(30), 본 연구에서는 저농도에서도 높은 NO 생성능을 나타내어 면역세포 자극을 통한 외부 물질 침입 등의 감염에 대한 1차 방어를 통해 면역반응이 일어나는 초기의 생체 방어에 유리한 작용을 할 수 있을 것으로 사료된다.

Cytokine 생성량

면역세포로부터 분비되는 다양한 cytokine은 타 면역세포의 기능조절과 신호전달에 중요한 역할을 하는 용해성 단백질로, 면역세포 간의 복잡한 cytokine network를 형성하여 면역계 전체의 반응 및 효율화에 공헌한다고 알려져 있다(31). AP, APF- I 및 APF- II를 처리하여 대식세포의 배양 상등액에서 cytokine을 측정하는 결과는 Fig. 4와 같다. Cy-

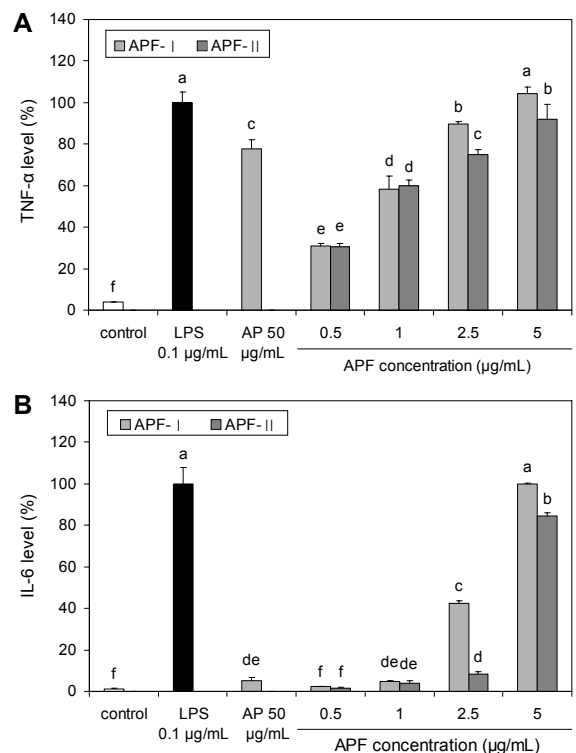


Fig. 4. Effect of polysaccharide fractions from ascidian tunic on the cytokine production by RAW 264.7 cell. (A) TNF- α , (B) IL-6. Means±SD (n=3) with different letters above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$). LPS, lipopolysaccharide; AP, crude polysaccharide from ascidian tunic; APF- I, polysaccharide fraction- I from ascidian tunic; APF- II, polysaccharide fraction- II from ascidian tunic.

tokine 분비능은 0.5~5 µg/mL 농도에서 유의적인 생성량 증가를 나타내었으며, 그중 TNF-α는 APF- I 5 µg/mL 농도에서 LPS(0.1 µg/mL) 대비 104.4%의 생성량을 나타내어 AP 50 µg/mL 농도의 77.57%에 비해 저농도에서도 유의적으로 높은 생성량을 보여주었다. IL-6 또한 APF- I 5 µg/mL 농도에서 100.1% 생성량 증가를 통해 LPS와 유사한 함량을 나타내었으며, 1 µg/mL 농도에서 4.60%로 AP 50 µg/mL의 5.25%와 비교 시 유사한 함량을 나타내어 정제를 통해 면역 활성이 증가되었음을 확인하였다. Hong 등 (32)은 군소에서 분리한 glycosaminoglycan을 RAW 264.7 대식세포주에 10 µg/mL로 처리하여 TNF-α 및 IL-6 생성

량을 확인한 결과, LPS 1 µg/mL 처리군과 유사한 경향을 나타내었다고 보고하였다. TNF-α는 인체에 침입한 병원체에 대한 숙주의 방어에 관여하고 또한 IL-1, IL-6, IFNs와 같은 cytokine들의 분비를 유도함으로써 인체의 면역반응을 조절한다고 알려져 있으며(33), IL-6는 T cell과 대식세포에서 분비되는 cytokine으로 외부 침입인자에 의한 인체 감염 시 면역반응을 촉진시키는 역할을 한다. 특히 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine의 분비는 감염에 의한 숙주의 생존 및 손상된 조직의 복구에 필수적이라고 알려져 있어(34), 조다당류 정제물 처리에 의한 TNF-α 및 IL-6의 생성량이 증가함에 따라 질병 발생 시 면역능을 조절하는

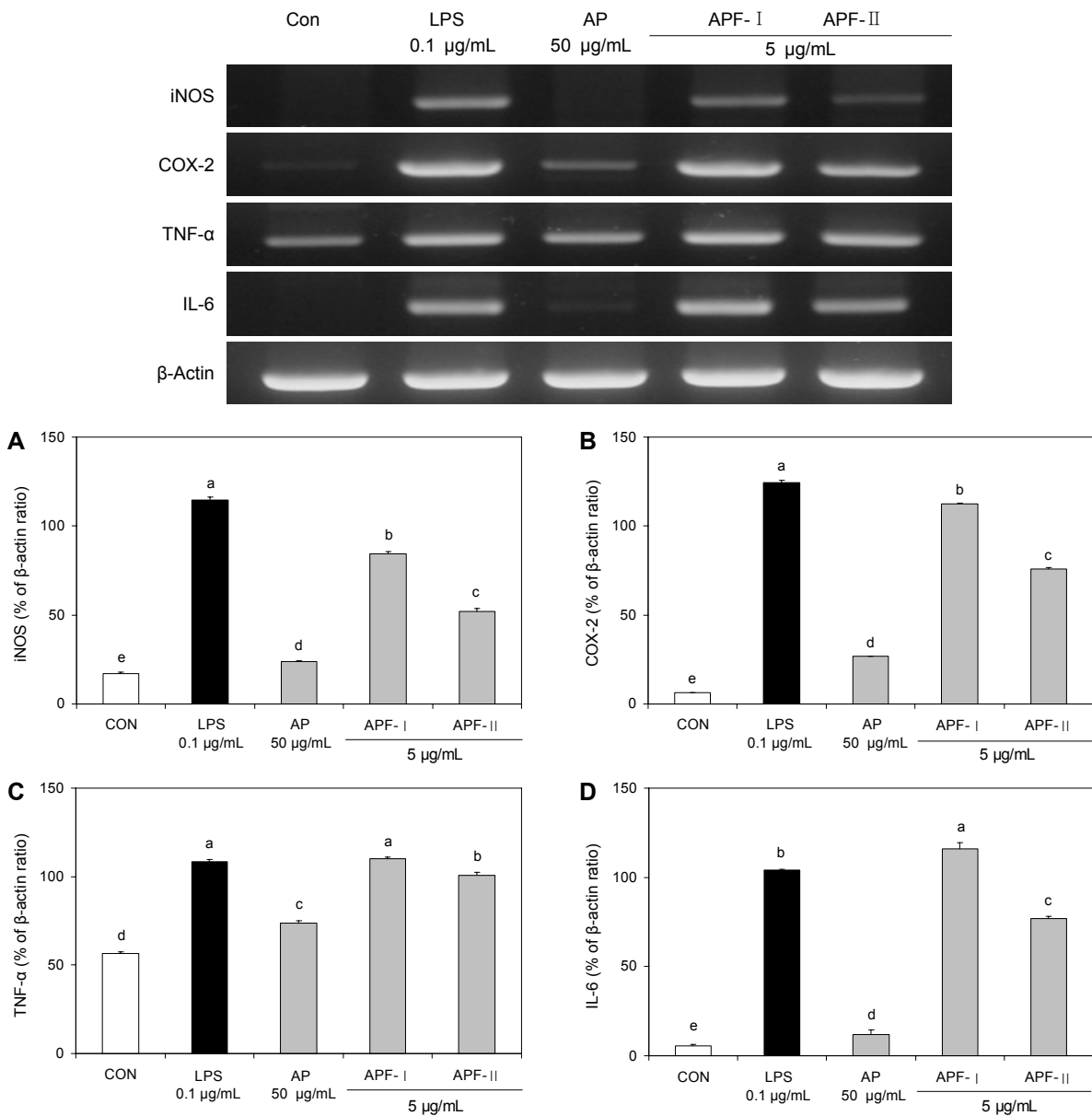


Fig. 5. RT-PCR analysis of iNOS (A), COX-2 (B), TNF-α (C), and IL-6 (D) mRNA expression by RAW 264.7 cell. Means±SD (n=3) with different letters above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). LPS, lipopolysaccharide; AP, crude polysaccharide from ascidian tunic; APF- I , polysaccharide fraction- I from ascidian tunic; APF- II , polysaccharide fraction- II from ascidian tunic.

중요한 내인성 인자 증가로 인한 암, 천식 및 류마티스 관절염 등의 예방 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

면역관련 유전자 발현

우렁챙이 껍질 유래 조다당류 및 조다당류 정제물을 대식세포주와 함께 배양한 후 total RNA를 추출하여 역전사 효소로 cDNA를 합성하고 primer를 이용하여 중합 효소연쇄반응(PCR)으로 mRNA 발현량을 증폭시킨 결과를 Fig. 5에 나타내었다. iNOS 및 COX-2의 발현량 증가를 측정된 결과, 정제물(5 µg/mL)을 처리한 APF-I 구간에서 β-actin 대비 각각 84.27% 및 112.50%의 가장 높은 발현량을 보여 대조군과 유의적인 차이를 확인할 수 있었으며 LPS(0.1 µg/mL) 처리군보다 높은 발현량(114.51% 및 124.38%)을 나타내었다. 반면 AP는 iNOS 및 COX-2에서 각각 23.80% 및 26.65%로 낮은 발현량을 보여 조다당류 추출물에 비해 다당류 정제물에서 유전자 발현이 강하게 나타남을 확인하였다. 또한 cytokine 생성량을 확인하기 위한 TNF-α 및 IL-6 mRNA 발현량을 확인한 결과 iNOS 및 COX-2의 결과와 유사하게 APF-I 구간에서 대조군(56.75% 및 5.56%)과 AP(73.73% 및 11.80%)에 비해 밴드의 발현이 현저히 증가하여(110.13% 및 116.13%), cytokine 생성량과 일치하는 경향을 나타내었다. Na 등(35)은 매생이 유래 정제 다당의 면역관련 유전자 발현에서 정제 다당 5~10 µg/mL 처리 시 양성대조군으로 사용된 LPS와 유사한 발현량을 나타내었으며, Chae 등(36)은 별불가사리 추출물의 생쥐 비장 면역세포 활성화 효과에서 1,000 µg/mL 농도에서 양성대조군으로 사용된 LPS와 유사한 발현량을 나타냄에 따라 대식세포의 활성 증진에 기인한다고 보고하였다. 이를 통해 다당류 정제물의 면역 활성이 조다당류 추출물에 비해 유의적으로 높은 발현을 나타냄을 확인하였으며 우렁챙이 껍질의 효용 가치 증대를 통한 다양한 기능성식품 소재로의 활용으로 폐자원 이용 증대와 해역의 오염 및 여러 문제점을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 우렁챙이 껍질 유래 다당류의 기능성식품 소재로의 활용 가능성을 확인하기 위하여 조다당류의 분리 및 정제를 통해 획분을 얻었으며 다양한 면역증강 효과를 확인하였다. 건조된 조다당류를 DEAE-sepharose CL-6B를 이용하여 크로마토그래피한 후 총당 및 uronic acid 함량을 분석한 결과, 증류수로 용출되는 비흡착 획분(APF-I, fraction No. 11~17)과 흡착된 후 NaCl 용액에 의해 용출되는 획분(APF-II, fraction No. 22~37)을 얻었다. 정제된 APF-I 및 APF-II의 이화학적 특성으로 총당 함량은 각각 66.62%, 27.03%, uronic acid 함량은 47.53%, 15.87%, hexosamine 함량은 16.62%, 46.79% 및 단백질 함량은 2.43%, 4.94%로 나타났다. APF-I 및 APF-II에 대해

RAW 264.7 세포에 처리하여 독성을 평가한 결과 5 µg/mL 농도까지 유의적으로 세포사멸이 나타나지 않아 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다. Nitric oxide 생산량은 APF-I 이 5 µg/mL 농도에서 22.23 µm 함량을 나타내어 LPS 대비 73.48%로 타 구간에 비해 높은 생성량을 나타내었으며, cytokine 생성량(TNF-α 및 IL-6) 또한 APF-I 5 µg/mL 농도에서 각각 LPS 대비 104%, 100.1%를 나타내어 LPS와 유사한 생성량을 나타내었다. Polymerase chain reaction을 통한 면역관련 유전자 발현 분석 결과, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6에서 APF-I 구간에서 LPS 처리군보다 높은 발현량을 나타내어 면역증강을 목적으로 한 기능성식품 개발에 활용 가능하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대구가톨릭대학교 해양바이오산업연구센터의 지원에 의한 것입니다.

REFERENCES

1. Yamada H. 1992. Chemical and pharmacological studies on efficacy of Japanese and Chinese herbal medicines. *Kitasato Arch Exp Med* 65: 159-180.
2. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287-306.
3. Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. 2000. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 13: 49-54.
4. Belardelli F. 1995. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis* 103: 161-179.
5. Liu YJ. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106: 259-262.
6. Salazar-Mather TP, Hokeness KL. 2003. Calling in the troops: regulation of inflammatory cell trafficking through innate cytokine/chemokine networks. *Viral Immunol* 16: 291-306.
7. Flurkey WH. 1991. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J Food Sci* 56: 93-95.
8. Jung DW, Park SI. 2005. Effect of green tea powder on the growth inhibition of oral bacteria in yoghurt. *Korean J Food Sci Ani Resour* 25: 500-506.
9. Byun MW. 2013. Immunomodulatory activities of apple seed extracts on macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1513-1517.
10. Cho DM, Bae KJ, Choi GH, Lee JW. 2011. The market analysis and perspectives of polysaccharide in Japan. *J Chitin Chitosan* 16: 157-163.
11. Lee SJ, Ha WH, Choi HJ, Cho SY, Choi JW. 2010. Antihyperlipidemic and antidiabetic activities of the ascidian tunic in Sprague-Dawley rats. *Kor J Fish Aquat Sci* 43: 567-572.
12. Kang IS, Youn HS, Park JY, Chun BS. 2006. Extraction of β-carotene from Ascidian tunic (*Halocynthia roretzi*) using supercritical carbon dioxide and co-solvent. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21: 194-198.
13. Pavão MS, Albano RM, Lawson AM, Mourão PA. 1989.

- Structural heterogeneity among unique sulfated-L-galactans from different species of ascidians (tunicate). *J Biol Chem* 264: 9972-9979.
14. Hong BI, Jung BC, Jung WJ, Ruck JH, Choi BD, Lee KH. 2002. Utilization of pigments and tunic components of ascidian as an improved feed aids for aquaculture: 3. Functional properties of sulfated polysaccharides from ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic. *J Korean Fish Soc* 35: 671-675.
 15. Lee KH, Choi BD, Hong BI, Jung BC, Ruck JH, Jung WJ. 1998. Functional properties of sulfated polysaccharides in ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic. *J Korean Fish Soc* 31: 447-451.
 16. Jeong SH. 2003. Characterization of glycosaminoglycans from the ascidian tunic. *MS Thesis*. Gyeongsang National University, Jinju, Korea. p 1-46.
 17. Park SH, Jeong SB, Choi BD. 2013. Immuno- and anti-cancer activities of *Halocynthia roretzi* tunic extracts on cells. *J Agric Life Sci* 47: 163-170.
 18. Saha AK, Brewer CF. 1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr Res* 254: 157-167.
 19. Cesaretti M, Luppi E, Maccari F, Volpi N. 2003. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydr Polym* 54: 59-61.
 20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 21. Blix G. 1948. The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. *Acta Chem Scand* 2: 467-473.
 22. Pavão MS, Mourão PA, Mulloy B, Tollefsen DM. 1995. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian: Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem* 270: 31027-31036.
 23. Baginski T, Hirohashi N, Hoshi M. 1999. Sulfated O-linked glycans of the vitelline coat as ligands in gamete interaction in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev Growth Differ* 41: 357-364.
 24. Yu KW, Kim YS, Shin KS, Kim JM, Suh HJ. 2005. Macrophage-stimulating activity of exo-biopolymer from cultured rice bran with *Monascus pilosus*. *Appl Biochem Biotechnol* 126: 35-48.
 25. Koo JG, Jo KS, Do JR, Park JH, Yang CB. 1995. Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. *J Korean Fish Soc* 28: 659-666.
 26. Kumar V, Nagar S, Tripathi YC. 2014. Do assorted approaches aid in estimation of uronic acids? Case studies on *Tinospora sinensis* polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 70: 360-363.
 27. Albano RM, Mourão PA. 1986. Isolation, fractionation, and preliminary characterization of a novel class of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata Tunicata). *J Biol Chem* 261: 758-765.
 28. Ryu HS, Kim HS. 2006. Effect of *Zingiber officinale* and *Hizikia fusiforme* water extracts on NO production in macrophage of mice. *Korean J Food & Nutr* 19: 327-331.
 29. Jung SH, Park KU, Kim JY, Park CK, Choi KS, Seo KI. 2009. Biological activities of crude polysaccharides and crude saponins from *Salicornia herbacea*. *Korean J Food Preserv* 1: 109-114.
 30. Seo SY, Pang J, Li R, Kwon J, Ahn MS, Eun JS. 2009. Effects of the combined extracts of *Glycine max* Merr. and *Glycyrrhiza uralensis* on the activity of murine splenocytes and macrophages. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 23: 1385-1391.
 31. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387: 917-921.
 32. Hong Y, Park S, Yoon BY, Choi BD, Choi YJ. 2011. Screen of functional activity of polysaccharide and glycosaminoglycan from sea hare (*Aplysia kurodai*) by cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 14-19.
 33. Jeong HJ, Chung HS, An HJ, Seo SW, Kim TG, Won JH, Shin JY, Ahn KS, Kim HM. 2004. The immune-enhancing effect of the herbal combination Bouum-Myunyeuk-Dan. *Biol Pharm Bull* 27: 29-33.
 34. Ohta Y, Lee JB, Hayashi K, Fujita A, Park DK, Hayashi T. 2007. In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. *J Agric Food Chem* 55: 10194-10199.
 35. Na YS, Kim WJ, Kim SM, Park JK, Lee SM, Kim SO, Synytsya A, Park YI. 2010. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. *Int Immunopharmacol* 10: 364-370.
 36. Chae SY, Kim MJ, Kim DS, Park JE, Jo SK, Yee ST. 2007. Effect of *Asterina pectinifera* extracts on the activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 269-275.