

LPS 유도 RAW 264.7 세포와 마우스 모델에서 참치(*Katsuwonus pelamis*) 유의 항염증 효과

강보경¹, 김민지², 김꽃봉우리², 안나경¹, 최연욱¹, 박시우¹, 박원민¹, 김보람¹, 박지혜¹, 배난영¹, 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

Received: December 2, 2014 / Revised: January 30, 2015 / Accepted: March 5, 2015

The Anti-inflammatory Effect of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Oil in LPS-induced RAW 264.7 Cells and Mouse Models

Bo-Kyeong Kang¹, Min-Ji Kim², Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Na-Kyung Ahn¹, Yeon-Uk Choi¹, Si-Woo Bark¹, Won-Min Pak¹, Bo-Ram Kim¹, Ji-Hye Park¹, Nan-Young Bae¹, and Dong-Hyun Ahn^{1*}

¹Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 619-911, Republic of Korea

This study was carried out to demonstrate the anti-inflammatory effect of tuna oil (TO) using LPS-induced inflammation responses and mouse models. First, nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines levels were suppressed up to 50% with increasing concentrations of TO without causing any cytotoxicity. Also, the expression of a variety of proteins, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear factor kappa B (NF-κB), was suppressed in a dose-dependent manner by treatment with TO. Furthermore, TO also inhibited the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and p38 protein kinase (p38). Moreover, in *in vivo* testing the formation of ear edema was reduced at the highest dose tested compared to that in the control, and a reduction of ear thickness and the number of mast cells was observed in histological analysis. In acute toxicity test, no mortalities occurred in mice administrated 5,000 mg/kg body weight of TO over a two-week observation period. Our results suggest that TO has a considerable anti-inflammatory property through the suppression of inflammatory mediator productions and that it could prove to be useful as a potential anti-inflammatory therapeutic material.

Keywords: Tuna oil, anti-inflammatory effect, ear edema, cytokine

서 론

염증은 외부 감염이나, 생체 내의 대사산물로 인한 다양한 자극에 대한 생체 내 방어기전으로, 다양한 염증 매개인자의 활성화에 따라 홍반, 부종, 열, 통증 및 기능이상 등을 유발하는 반응이다[34]. 특히 대식세포(macrophage)는 lipopolysaccharide (LPS)의 자극에 의해 활성화되어 nuclear factor-kappa B (NF-κB) 의존 경로와 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 의존 경로의 두가지 경로를 통해

염증 반응을 유도하게 된다. 그 결과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)가 발현되고, nitric oxide (NO) 및 pro-inflammatory cytokine을 분비하여 염증 반응을 유도한다[38]. 이러한 염증 반응은 다양한 질병의 생리 및 병리학적 과정에 폭넓게 관여하는 것으로, 특히 만성 질환의 유병률이 증가하고 있는 현대에서 염증반응은 치매, 심혈관질환, 비만, 대사성 증후군 및 비만 등의 만성 질환의 원인으로 주목받고 있다[10]. 따라서 다양한 염증 반응 매개인자와 신호전달 경로의 단백질 발현을 조절할 수 있는 물질은 만성 질환의 예방 및 억제를 위한 기능성 소재로 활용할 수 있는 가능성이 높다고 여겨지고 있다[9]. 이러한 염증 반응의 억제를 위해 다양한 스테로이드 및 비스테로이드성 항염증제가 사용되고 있으나, 부작용 발생 우려로 인해 장

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

기간 사용이 어려워, 최근 이러한 제제를 대체할 수 있는 천연물 유래 유효성분을 얻으려는 노력이 증가하고 있다[28].

한편, 참치(*Katsuwonus pelamis*)는 농어목 고등어과의 바닷물고기로, 단백질 함량이 높아 영양학적으로 우수하며, 특히 eicosapentaenoic acid (EPA, 22:5n-3)와 docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3)와 같은 다불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA)를 다량 함유하는 대표적인 등푸른 생선이다[18]. 일반적으로 정어리, 참치와 같은 등푸른 생선의 어유에는 EPA 및 DHA가 다량 함유되어 있는데[2], 최근 다양한 역학조사 및 인체와 동물을 대상으로한 연구 결과 이러한 n-3계 고도불포화지방산이 체내에서 다양한 생리 활성 기능을 가지는 것으로 보고되었다. 특히 혈액 내 중성지방, 콜레스테롤 수치를 감소시키고, 혈소판 응집을 감소시켜 심혈관계 질병을 예방하고[33, 44], 뇌, 망막, 신경조직의 성장과 발달에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[40]. 이렇듯 EPA 및 DHA의 우수한 생리 활성 효과에 대해 다방면의 연구가 국내외에서 활발히 이루어지고 있으며, 특히 염증 mediator인 프로스타글란딘, 트롬복산, 류코트리엔 등의 생합성을 억제하고[35], 인체 단핵구 및 마우스의 대식세포에 대해 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 cytokine을 감소시키고[5], NF- κ B 전사단계의 구성요소에 영향을 미쳐[45] 항염 효과를 가지는 것으로 보고된 바 있다.

그러나 아직까지 참치로부터 분리한 참치유에 대한 연구로는 그 이용을 위한 분리정제법[39] 및 탈취공정에 대한 연구[3]와, 항암효과[20] 및 지방대사에 미치는 영향[22]에 대한 연구가 대부분이며, 항염증 효과 및 그 기전에 대한 연구는 이루어진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 인체 유용 물질인 EPA 및 DHA를 다량 함유하는 참치유의 항염증 효과 및 기전을 *in vitro* 및 *in vivo* type의 실험 모델을 이용하여 밝히고자 하였으며, 본 연구 결과가 참치유의 다양한 식품 분야에 대한 이용 및 우수한 염증 예방 및 치료제로의 소재 개발에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 참치유는 skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*)의 oil로 (주)동원 F&B에서 제공받았으며, 밀봉하여 4°C에서 저장하며 실험 전 상온에 약 5분간 방치 후 사용하였다.

실험 동물

생후 8주령의 수컷 ICR 마우스를 오리엔트바이오(Orient

Co., Seongnam, Korea)로부터 구입하여 귀부종 및 조직 관찰 실험에 사용하였다. 단기 독성 평가에는 생후 10주령의 암컷 Balb/c 마우스를 이용하였다. 마우스는 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$, 12시간 명암주기가 유지되는 동물사육실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였으며, 동물실험은 부경대학교 동물실험 윤리지침을 준수하여, 부경대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 시행되었다.

세포배양

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM (GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

세포 독성 측정

시료의 세포독성을 MTT assay를 통해 살펴보았다[32]. RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 96-well plate에 seeding하고, 20시간 동안 전 배양 후 TO를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 첨가하여 37°C , 5% CO_2 incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 5 mg/ml의 MTT 시약(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT))을 첨가하여 2시간 재 배양한 후 이를 4°C , 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 각 well에 DMSO를 첨가하고 생성된 formazan을 용해시켰으며, 이를 microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

Proliferation Index (%)

$$= \text{sample 흡광도} / \text{control 흡광도} \times 100$$

NO 생성량 측정

Griess 반응[26]을 이용하여 배양액 내에 존재하는 nitrite 농도를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 2.5×10^5 cells/ml의 농도로 24-well plate에 접종하고, 5% CO_2 incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS와 시료를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 24시간 재 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 상층액과 griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는

sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정

Pro-inflammatory cytokine 분비 억제 효능을 알아보기 위하여, RAW 264.7 세포를 2.5×10^5 cells/ml로 24-well plate에 접종하고 18시간 동안 전 배양하였다. 세포에 1 µg/ml의 LPS와 TO를 처리하여 12시간 재 배양하였다. 배양액 내의 IL-6, TNF-α 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse IL-6, TNF-α 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating하였으며, 이를 0.05% tween 20을 포함하는 PBST (Phosphate buffered saline with 0.05% tween 20)로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척 후, 각 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 후 biotinylated anti-mouse IL-6, TNF-α 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 암반응시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 microplate reader (Model 550, Bio-rad)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현량 측정

iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현에 미치는 TO의 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 iNOS, COX-2의 경우 1×10^6 cells/ml, NF-κB의 경우 4×10^6 cells/ml로 조절하여 20 시간 전 배양 하였다. 세포에 1 µg/ml의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/ml의 TO를 처리하여 iNOS, COX-2의 경우 18시간, NF-κB의 경우 30분 재 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 세포질 내의 iNOS 및 COX-2 단백질 측정을 위하여 cytosol extraction buffer (50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 µg/ml aprotinin, 1% triton X-100, and 0.1% NP-40)를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis시켰다. 핵 내의 NF-κB p65 단백질 측정을 위하여 먼저 hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)를 첨가하여 15분간 4°C에서 lysis시켜 crude cytoplasmic

fraction을 제거한 후, 남은 pellet에 nuclear extraction buffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol (DTT))을 첨가하여 lysis시킨 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였으며, 30 µl의 lysate를 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-rad)에 200 mA에서 1시간 동안 전사시킨 후, 5% Skim milk가 포함된 TBS (tris buffered saline; pH7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. iNOS, COX-2 및 NF-κB p65의 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF-κB p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시키고 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 1-3분간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool (GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)를 이용하여 가시화 하였다.

MAP kinase (JNK, ERK, p38) 발현량 측정

MAPKs의 발현에 미치는 TO의 억제 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1×10^6 cells/ml로 18시간 전 배양하고 TO를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/ml)로 처리하여 30분 동안 본 배양하였으며, 이후의 실험은 iNOS, COX-2 및 NF-κB와 동일한 방법으로 진행하였다. 인산화된 c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 protein kinase (p38)의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse JNK, ERK 및 p38 (Cell Signalling Technology, Inc., Denvers, MA, USA)을 이용하여 1:5,000으로 희석하여 사용하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

TO의 항염증 효과에 대한 *in vivo* type 실험의 일환으로 귀 부종 억제율을 측정하고 조직 관찰을 진행하였다. ICR 마우스에 TO를 10, 50 및 250 mg/kg body weight으로 200 µl씩 경구투여하고, 1시간 후, 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 µl/ear 농도로 도포하였다. Croton oil을 처리 5시간 후에 귀 두께를 측정하였으며, 두께의 증가를 부종의 형성으로 간주하였다. 조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 TO를 100 mg/ml 농도로 20 µl씩 도포하고 15분 뒤, 5% croton oil을 20 µl씩 도포하였다. 6시간 뒤, diethylether로 마취사시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고

정하였다. 고정 후 파라핀 block을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin (H&E) 및 toluidine-blue (TB) 염색을 통해 조직을 관찰하였다.

단기 독성 평가

TO의 안전성을 평가하기 위해 단기 투여에 의한 급성경구독성평가를 실시하였다. 본 실험은 식품의약품안전처 고시 제 2014-136호(2014년 7월 30일 개정) 의약품등의 독성 시험기준[41]에 의거하여 진행하였다. Balb/c 마우스를 실험 시작 전 4-6시간 정도 절식시킨 후에 TO를 300, 2,000 및 5,000 mg/kg body weight 농도로 경구 투여 하였으며, 이후 6시간 동안 비정상적인 행동 등의 경과를 관찰하였고 2주까지 사망 여부를 지속적으로 관찰하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

참치유의 세포독성

참치유의 RAW 264.7 cell에 대한 세포독성을 알아보고 실험 농도 조건의 설정을 위해 MTT assay를 실시하였다. 그 결과(Fig. 1A), TO를 0.1-100 $\mu\text{g/ml}$ 으로 처리 시 농도 의존적으로 세포 증식률이 증가하였으며, 특히 TO를 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리 시 무처리구에 비해 약 113%의 증식능을 나

타냈다. 이를 통해, TO가 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 RAW 264.7 cell에 대한 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였고 따라서 본 연구에 사용된 TO의 최고 농도는 세포에 독성을 나타내지 않는 100 $\mu\text{g/ml}$ 으로 설정하였다. 이와 동일한 결과로 Cha와 Lim 등[8]도 치자 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 유의적인 대식세포의 증식능을 보였으며, 이에 대해 세포독성을 나타내지 않았다고 보고하였다.

NO 억제 효과

NO는 체내 염증 반응 시 대식세포와 같은 면역세포에서 iNOS에 의해 L-arginin으로부터 생성되는 radical이다. 이러한 NO는 체내에서 2차 신호전달자로서 생체 방어기능, 신호전달기능 등의 주요한 역할을 하지만[24], 과도한 NO의 발생은 숙주의 염증 반응을 심화시켜 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증 반응에 의한 세포 및 조직손상을 일으킬 뿐만 아니라 septic shock 등의 만성 질환 및 자가면역 질환을 유발시켜 문제가 되고 있다[15]. 따라서 현재 NO 생성 저해 효과를 가지는 물질에 대하여 염증반응을 비롯한 septic shock, 동맥경화 조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[6]. TO의 처리에 의한 NO 생성 정도를 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS와 TO를 농도별(0.1, 1, 10, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$)로 첨가하여 생성된 NO를 griess 시약을 이용하여 측정하였다. 그 결과(Fig. 1B), LPS만을 처리한 대조구에서 생성된 NO의 양이 $56.67 \pm 0.49 \mu\text{M}$ 이었으며, TO를 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리 시 $30.83 \pm 0.42 \mu\text{M}$ 으로 약 45%의 NO 억제 효과를 보임을 확인하였다. 본 실험에 사용한 TO와 같이, 일반적으로 어유에는 EPA 및 DHA와 같은 long-chain의 PUFA가 다량 함유되어 있는 것으로

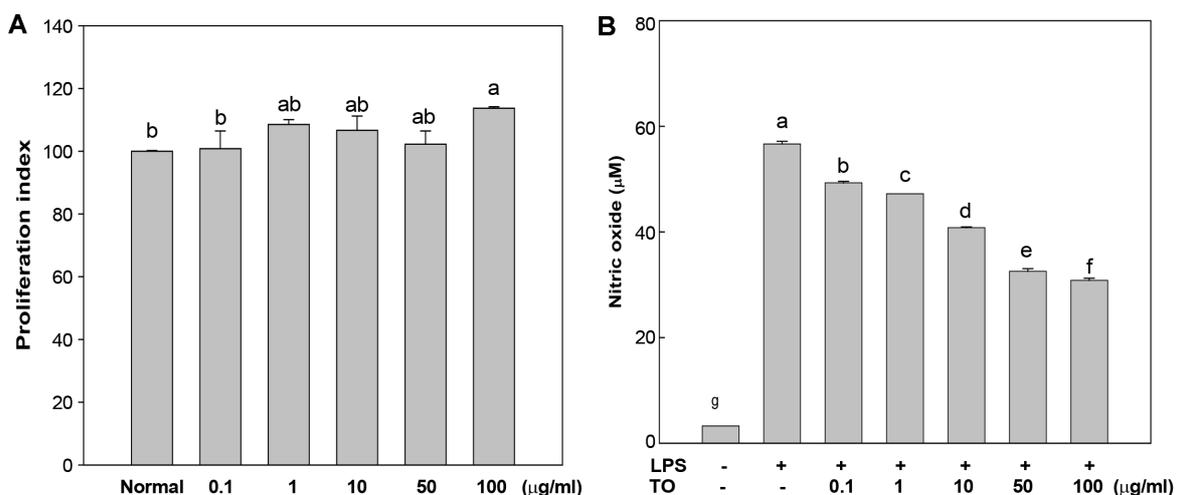


Fig. 1. The *in vitro* anti-inflammatory effect of tuna oil (TO) in RAW 264.7 cells. (A) cell viability of RAW 264.7 cells, (B) NO levels determined from the culture supernatant of RAW 264.7 cells. Proliferation index = (sample O.D / control O.D) \times 100. Means with different letters (a-g) above bars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

보고되었다[11]. 본 연구 결과를 통해 TO가 염증 반응에서 NO 억제 효과를 가짐을 알 수 있었으며, 이는 Khair-El-Din 등[16]이 fish oil의 주성분인 DHA가 염증 반응 시 핵내의 iNOS의 전사단계에서 iNOS mRNA의 발현 및 전사를 억제하며, iNOS promoter를 억제하는 3단계의 억제 기작을 통해 궁극적으로 NO 발생을 현저히 억제하여 항염증 효과를 가진다는 보고와 일치하였다.

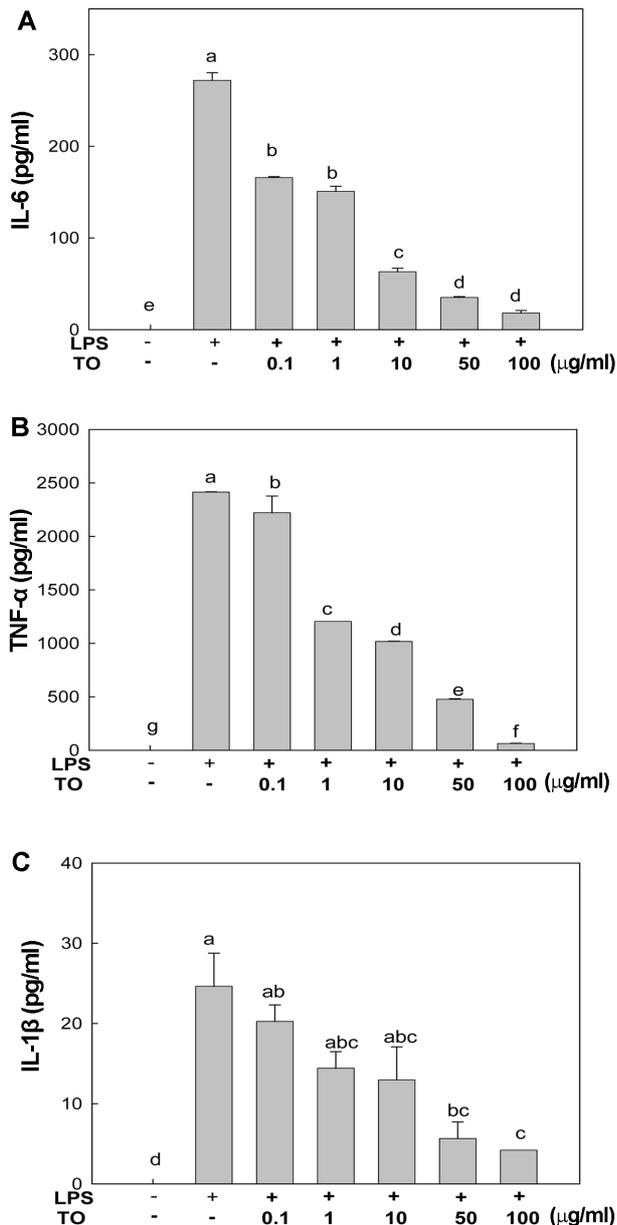


Fig. 2. The *in vitro* anti-inflammatory effects of tuna oil (TO) in RAW 264.7 cells. The levels of IL-6 (A), TNF-α (B), and IL-1β (C) from the culture supernatant of RAW 264.7 cells. Means with different letters (a-g) above bars are significantly different ($p < 0.05$).

Pro-inflammatory cytokine 억제 효과

염증 반응에서 cytokine의 분비에 미치는 TO의 효과를 살펴보기 위해, LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 cell에 TO를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/ml)로 처리하여 배양 상층액의 IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 양을 ELISA kit를 이용하여 정량 하였다. 그 결과, 모든 cytokine에 대하여 농도의존적 억제 효과를 보임을 확인하였다. 먼저 IL-6의 경우(Fig. 2A), LPS 단독 처리 시 약 271.93 ± 8.33 pg/ml의 분비를 보였으나, TO를 50 및 100 μg/ml로 처리 시 각각 35.08 ± 0.93, 18.07 ± 2.78 pg/ml로 매우 낮은 분비량을 보였다. 특히 100 μg/ml로 처리 시에는 93% 이상의 억제 효과를 보였다. 또한 TNF-α의 경우(Fig. 2B)에도 마찬가지로 우수한 농도의존적 억제 효과를 보였는데, 1 μg/ml의 낮은 농도로 처리 시에도 50% 이상의 억제 효과를 보임을 확인하였다. IL-1β의 경우, LPS 단독 처리 시 24.64 ± 4.13 pg/ml의 분비를 보였으나, 100 μg/ml로 TO를 처리하였을 때 4.20 ± 0.00 pg/ml의 분비를 보여 83%의 억제효과를 보였다. TO의 주 성분으로 보고된 EPA 및 DHA는 다양한 연구에서 항염증 효과가 보고된 바 있으며[1, 16, 27], 본 연구 결과에서 pro-inflammatory cytokine에 대해 우수한 억제 효과를 보이는 것은 주 성분인 EPA 및 DHA의 효과에 기인한 것으로 사료된다. 특히 Lo 등[27]의 연구에 따르면, LPS로 유도한 RAW 264.7 cell의 염증반응에서 EPA 처리 시 TNF-α를 효과적으로 억제한다고 보고하였으며, Aldridge [1]의 보고에 따르면 n-3 지방산 에틸렌인 omegaven 처리 시 우수한 TNF-α 분비 억제 효과를 가진다고 보고하였다. LPS는 대식세포의 TLR-4와 결합하는 ligand로, 표면 수용체 복합체의 활성화를 통해 MyD88, TIRAP/Mal, TRIF 및 TRAM과 같은 TIR 영역을 포함하는 어댑터 단백질과 결합하여 하위 신호망의 활성화를 매개한다[21]. 대식세포에서 LPS에 의해 분비되는 IL-6, TNF-α 및 IL-1β는 pro-inflammatory cytokine으로 세균의 침입을 효과적으로 방어하는 역할을 한다. 그 중 IL-6는 B cell을 plasma cell으로 분화시켜 항체 생산을 촉진하여 급성염증 반응을 만성 단계로 전환시키는 기능을 한다[13]. 또한 TNF-α는 전신성 염증에 관여하는 cytokine으로, 대식세포 이외에도 NK cell이나 CD4+ lymphocyte에서도 생산된다. 이러한 TNF-α가 과량으로 생산되게 되면 발열, 세포사멸 등의 반응이 유도되며, IL-1β 및 IL-6의 발현을 촉진시킴으로써 패혈증, 알츠하이머, 암, 염증성 장 질환 등의 다양한 질병의 요인이 된다[12, 13]. 다음으로 IL-1β는 활성화된 대식세포에서 caspase-1에 의해 활성형으로 전환되어 염증 반응의 주요 매개체로 작용하며, 특히 Th cell을 활성화시키고 T cell로 하여금 IL-2와 같은 cytokine의 분비를 증가시켜 면역 반응을 활성화시킨다[8]. 따라서 본 연구 결과, TO가 염증 반응에서 활발하게 작용하여 염증 반응을 활성화시키는

pro-inflammatory cytokine의 분비를 효과적으로 억제하는 것을 확인하여 우수한 항염증 효과를 가짐을 확인하였다.

iNOS, COX-2, NF-κB 억제효과

LPS에 의해 유도되는 염증반응은 NF-κB 및 MAPKs의 두 가지 pathway에 의해 일어난다[14]. 특히 NF-κB는 전사인자로 염증 반응 및 면역 반응의 다양한 유전자 발현에 관여하여, 종양 형성, 자가면역질환 및 염증 반응에 중요한 역할을 담당한다[23]. 이러한 NF-κB는 세포질 내에 inhibitor kappa B (IκB)와 결합되어 불활성화 상태로 존재하는데, LPS와 같은 자극에 의해 이 IκB가 인산화되고 NF-κB와 분리되면서 활성을 가지게 된다. 이 과정에서 inhibitor kappa B kinase (Ikk)가 활성화되어, IκB alpha (IκBα)의 N-terminal 영역의 serine 잔기를 인산화시키고, 인산화된 IκBα는 그 lysine 잔기가 multi-ubiquitination되어 분해된다. 이 때 IκBα가 분해되면, NF-κB/IκBα의 복합체 상태에서는 불활성화 상태였던 NF-κB의 핵 이동 서열이 노출되면서 활성화되어 NF-κB가 핵 내로 이동하여 target gene promoter를 일으켜 iNOS, COX-2, 전염증성 cytokine의 생성을 유도한다[19]. 이렇게 활성화되는 인자 중 iNOS는 NO 생성효소인 NOS의 한 종류로, NOS에는 iNOS 이외에도 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS)의 동종효소가 알려져 있다. 이 중 iNOS는 대식세포가 interferon-

γ나 LPS 등의 다양한 염증 유도 인자에 노출된 경우 발현하는 효소로, 세포내에서 L-arginine을 NO로 전환시키는 기능을 하여, 과량의 NO를 생성시킨다[19, 36]. 이렇게 생성된 NO는 염증매개물질로 작용하여 염증성 cytokine의 발현을 유도하거나 COX-2의 생성을 촉진함과 동시에 활성산소와 결합하여 과산화질소 등 다른 독성 유기물질을 만들어 조직을 손상시키게 된다[36]. 염증 반응에서 또 하나의 주요 염증 매개물에는 prostaglandin (PG)가 있는데, 이는 COX-2에 의해 arachidonic acid로부터 유도되는 물질로, 염증 반응 시 통증의 원인 물질로 알려져 있다. 이러한 PG를 생성하는 COX-2는 체내에 2가지 동종 효소로 존재하는데, 정상 조직에서 일정한 수준으로 상시 발현되어 위장관 보호 및 신장 혈류 조절, 혈소판 응집 등 인체 기능 유지의 기능을 하는 COX-1 외에, 염증 반응 시에만 발생되어 다량의 PG를 생산하는 COX-2가 있다[36, 37]. 본 연구에서는 LPS로 염증 반응을 유도한 RAW 264.7 cell에 TO를 농도별로 처리하여 NF-κB와, NF-κB의 downstream 단계의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현의 억제 효과를 관찰하여, 앞선 결과의 cytokine 및 NO 분비에 대한 TO의 효과가 어떠한 pathway를 억제함으로써 나타난 결과인지 알아보고자 하였다. 먼저 핵 내부의 NF-κB 단백질 발현을 western blot을 통해 측정한 결과(Fig. 3A), TO를 100 μg/ml 농도로 처리 시 NF-κB의 분비를 무처리군과 유사한 정도로 억제하는 것을 확인하였다. 또한 iNOS

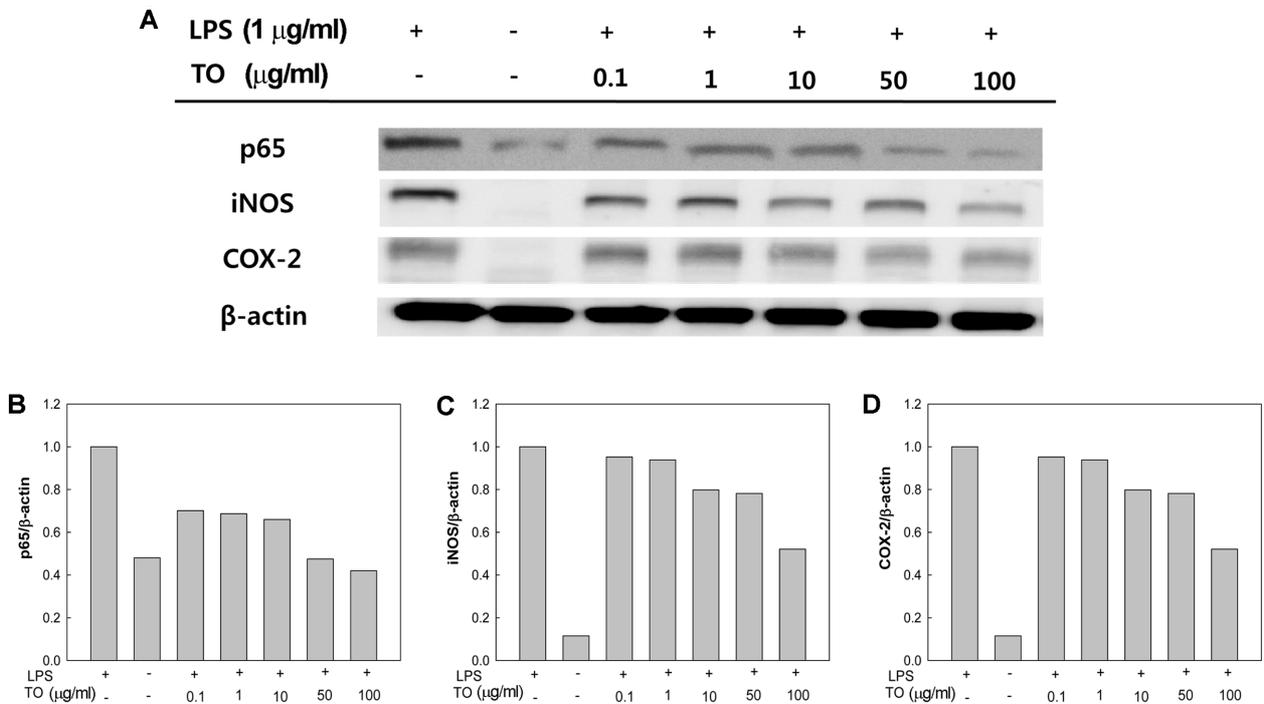


Fig. 3. Effect of tuna oil (TO) on western blot analysis of NF-κB p65, iNOS, and COX-2 protein expression on LPS-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells, and (B-D) relative unit of densitometries of such an expression.

및 COX-2의 단백질 발현도 TO를 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리 시, 두 경우 모두 약 48%의 억제 효과가 있음을 확인하였다. Weldon 등[43]의 연구에 따르면 LPS로 유도된 염증반응에서 DHA는 NF- κB 의 subunit의 일종인 p65의 핵내 수준을 상당히 감소시키고, 세포질 내의 I κB 의 발현을 증가시키는 기작을 통해 항염 효과를 가진다고 보고하였고, Lee 등[25] DHA 및 EPA가 NF- κB 의 활성을 억제함으로써 COX-2 발현 억제 효과를 가짐을 보고하였다. 위 결과로 미루어 볼 때, TO의 NF- κB , iNOS 및 COX-2에 대한 효과는 DHA 및 EPA에 의한 효과인 것으로 사료된다. 본 연구 결과를 통해, LPS 유도 염증 반응에서 TO가 전사인자인 NF- κB 의 활성화를 억제함에 따라, 그 downstream 단계인 iNOS 및 COX-2를 억제함으로써 NO, cytokine의 발현을 억제하여 항염증 효과를 가짐을 유추할 수 있으며, 본 연구에서는 다루지지 않았으나, TO가 COX-2에 대해 우수한 억제 효과를 가지는 것을 통해 PGs의 발현 억제 효과도 가질 것으로 기대할 수 있다.

MAPKs 억제효과

대식세포에서 LPS의 자극에 의해 활성화되는 기작에는 TLR4/MyD88/NF- κB 이외에도 MAPKs 의존 경로가 있다. 이러한 MAPK는 포유류에서는 JNK, ERK, p38의 3종이 알려져 있으며, 그 활성화는 각 효소의 tyrosine과 threonine 잔

기의 인산화에 의해 조절된다[21]. MAPKs의 활성화형은 downstream의 activator protein-1 (AP-1), c-AMP responsive element binding protein, activating transcription factor-2, NF- κB 의 serine 및 threonine 잔기를 인산화시키는 기능을 통해 염증 반응을 심화한다[21, 36]. 특히 JNK의 경우 I κB 의 직접적인 인산화를 유도하여, NF- κB 신호 네트워크를 활성화시키는 것으로 알려져 있다[21]. 또한 ERK 및 p38은 염증의 여러 경로 중에서 iNOS 및 NO 생성에 주요한 역할을 한다[17, 31]. 따라서 본 연구에서는 NF- κB 경로 억제 효과를 가지는 TO가 MAPKs 의존 경로에도 효과가 있는지를 입증하기 위하여 LPS 유도 염증 반응에서 세포 내 MAPKs의 인산화 정도를 western blot을 이용하여 측정하였다. 그 결과(Fig. 4), 세가지의 MAPKs 모두에 대해 억제 효과가 있음을 확인하였으며, 특히 p-JNK는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 TO를 처리하였을 시, LPS 단독 처리구에 비해 약 70% 이상 억제 효과를 보임을 확인하였다. 이 결과를 통해 JNK의 활성이 억제됨에 따라 I κB 의 활성화가 일부 억제되어 NF- κB 에 대한 억제 효과를 가지는 것을 유추할 수 있다. 이외에도 p-ERK 및 p-p38 또한 TO를 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리 시 약 40%의 억제 효과를 보임을 확인하였다. Babcock 등[5]의 연구에 따르면 omega-3 fatty acid가 AP-1 활성화의 바로 이전 단계인 JNK의 인산화를 억제하여 pro-inflammatory cytokine

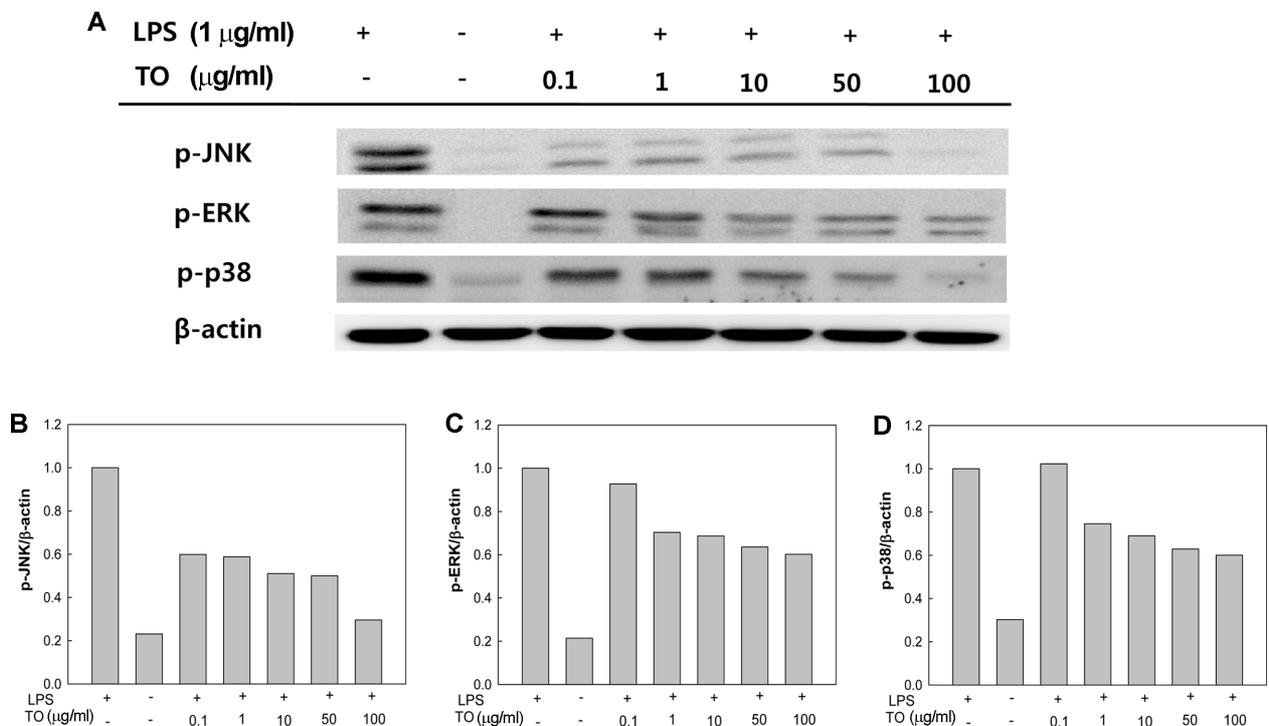


Fig. 4. Effect of tuna oil (TO) on western blot analysis of p-JNK, p-ERK, and p-p38 protein expression on LPS-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells, and (B-D) relative unit densitometries of such an expression.

의 발현을 억제한다고 보고하였으며, p38의 인산화에는 영향을 주지 않았다고 보고하였다. 본 연구 결과에서는 TO가 JNK 뿐만 아니라 ERK 및 p38의 인산화를 모두 억제하여 우수한 항염증 효과가 있는 것을 확인하여, 정제된 omega-3 fatty acid와는 다른 기작으로 항염 효과를 가지는 것을 확인하였으나, TO 내의 어떤 성분들의 복합적 작용에 의해 이러한 효과를 나타내는지에 대해서는 연구된 바 없어 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이상의 결과로 TO가 대식세포에서 NF-κB 및 MAPKs의 활성을 억제함으로써 iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine의 발현을 억제하여 항염증 효과를 가지는 것을 확인하였다.

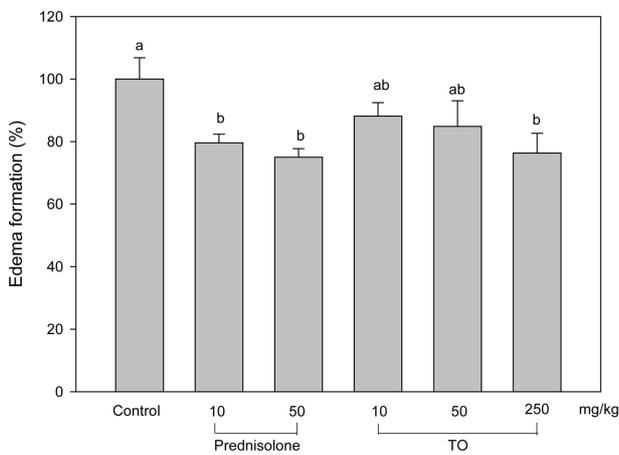


Fig. 5. Inhibitory effect of tuna oil (TO) on croton oil-induced mouse ear edema. Means with different letters (a-b) above bars are significantly different ($p < 0.05$).

귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

TO가 가지는 항염증 활성을 동물실험에서 평가하기 위해 croton oil 유도 마우스 귀 부종 실험을 진행하였다. Croton oil을 피부에 도포하면 피부는 즉각적으로 강한 급성 염증 반응을 유도하며, 이는 급성 염증에 대한 시료의 효능을 알아보는 대표적인 동물 모델이다[42]. 일반적으로 급성 염증 질환은 다양한 면역세포가 활성화되고, 혈관 확장 및 내피 부착인자의 발현으로 통증, 발열, 부종 등의 여러 증상을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 특히 염증 부위로 비만세포나 호중구 등의 백혈구가 주화성을 띠면서 모이는 특징을 가진다[4]. 본 연구에서는 TO의 항염증 효과를 현재 사용되고 있는 합성 항염증제와 비교하기 위해 steroid제의 일종인 prednisolone을 positive control로 이용하였다[42]. TO를 10, 50, 250 mg/kg body weight의 농도로 경구 투여한 후 croton oil을 도포하여 급성부종을 일으켰으며, 두께의 변화 및 국소적 염증세포의 침윤에 대한 TO의 억제 효과를 측정하였다. 그 결과(Fig. 5). TO의 적용에 의해 부종의 생성 정도가 통계적으로 유의하게 억제된 것을 확인하였으며, 250 mg/kg body weight으로 처리 시 약 20% 이상의 억제 효과를 보였다. 이 결과는 조직검사에서 나타났는데(Fig. 6), TO를 100 mg/ml 농도로 도포한 후 croton oil을 도포하였을 때, prednisolone 0.8 mg/ear 처리구와 유사한 정도로, 귀 조직의 경피 및 진피 두께의 발달을 억제한 것을 확인하였으며, 조직 내 비만세포의 침윤 또한 억제된 것을 확인하였다. 유사한 연구 결과로, Nauroth 등[29]은 카라기난 유도 마우스 발 부종 실험에서 DHA의 적용이 발 부종의 형성을 현저히 억제하였다고 보고하였으며, 또한 Camuesco 등[7]은

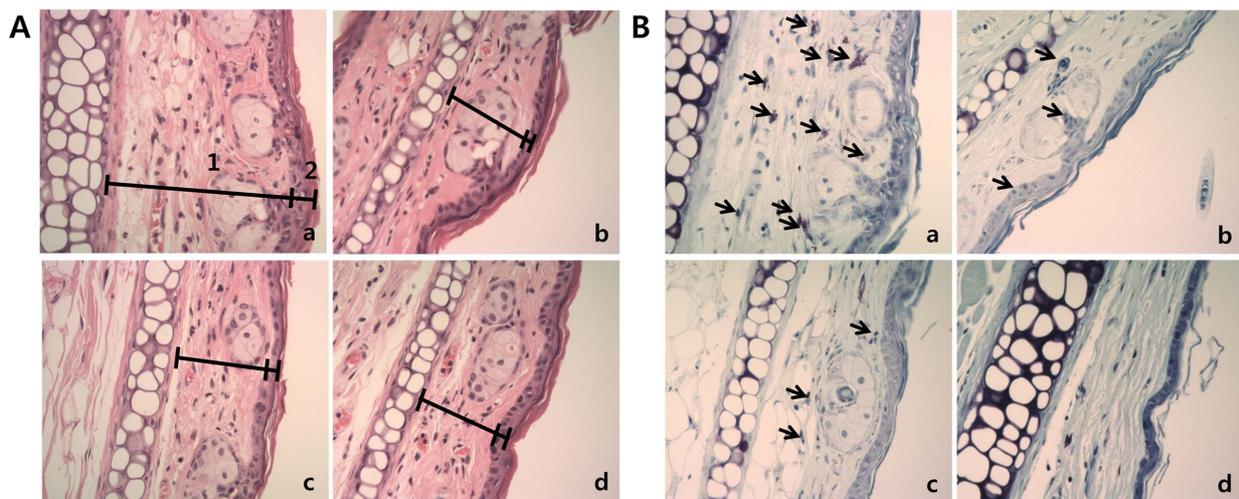


Fig. 6. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of 5% croton oil (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (D, non-inflamed), stained with (A) hematoxylin-eosin and (B) toluidine-blue, and examined under light microscopy (magnification: 200×). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b) and tuna oil 100 mg/ml (20 μl/ear) (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrow in (B) means infiltration of mast cells.

Table 1. Mortality of mice treated orally with tuna oil.

	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 ¹⁾	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2,000 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5,000 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

mg/kg body weight.

dextran sulfate sodium (DSS)으로 유도한 마우스 장염 모델에서 fish oil 경구투여가 현저한 장염 억제 효과를 가지는 것을 조직관찰을 통해 입증하였다.

단기 독성 평가

본 연구에서 TO의 우수한 항염증 효과를 보임을 입증하였다. 이에 대해 그 독성 또는 부작용을 살펴보고, 향후 새로운 기능성 식품 소재의 개발에 대한 기초 자료를 확보하기 위해 Balb/c 마우스를 이용하여 단기 경구 투여 독성시험을 실시하였다. TO를 300, 2,000 및 5,000 mg/kg 농도로 200 µl씩 경구 투여한 후 2주간 행동변화 및 치사율을 관찰한 결과(Table 1), 모든 시험군에서 투여 후 4시간 동안 이상행동이 관찰되지 않았으며, 2주까지 사망동물이 관찰되지 않았다. OECD test guideline 420 [30]에 따르면, 마우스에 2,000 mg/kg의 시료를 투여 시 사망하는 개체가 없는 경우 무독성으로 인정하므로 TO는 동물실험에 대해 안전한 무독성의 시료임을 확인하였다. 따라서 in vitro 및 vivo 실험에서 모두 매우 우수한 항염증 효과를 가지는 TO를 이용하여 안전성이 확보된 새로운 염증 예방 및 치료제 개발이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 참치유의 항염증 효과를 알아보기 위하여 in vitro 및 in vivo type의 실험을 진행하였다. 먼저 참치유 (TO)가 세포독성을 가지는지에 대해 알아보기 위해 MTT assay를 진행한 결과, 모든 첨가 농도에서 세포독성을 가지지 않는 것을 확인하였다. 세포독성을 가지지 않은 농도에서의 항염증 효과를 알아보기 위하여 염증성 매개 인자인 NO, IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 에 대한 항염증 효과를 살펴본 결과, TO의 첨가에 따라 각각 45%, 93%, 97%, 83%의 억제효과를 보임을 확인하였다. 또한 그 up-stream의 전사인자인 NF- κ B 및 MAPKs와 전염증성 효소인 iNOS, COX-2의 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. In vivo type 실험의 일환으로 croton oil 유도 마우스 귀 부종에 대한 억제 효과를 살펴본 결과, TO의 처리에 의해 경피 및 진피 두께의 발

달과, 염증 부위로의 mast cell 침윤이 억제됨을 확인하였다. TO의 효과적인 이용을 위해 그 안전성에 대한 평가로 급성 경구독성 평가를 진행한 결과, 경구독성을 유발하지 않음을 확인하였다. 본 연구 결과로 TO의 적용이 in vitro 및 in vivo type의 염증 모델에서 우수한 효과를 보임을 확인하여, TO가 효과적인 염증 예방 및 치료제로의 활용 가능성이 충분함을 입증하였다.

Acknowledgments

This study was a part of the project entitled 'Functional materials and foods using fisheries by-products', funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Korea (No.20130279).

References

- Aldridge C, Razzak A, Bobcock TA, Helton WS, Espat NJ. 2008. Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production is decreased by an omega-3 fatty acid emulsion. *J. Surg. Res.* **149**: 296-302.
- An S, Choe E. 2011. Effects of mustard oil addition to tuna oil-enriched emulsion on the oxidation under singlet oxygen. *Bio-catal. Agric. Bioethanol.* **1**: 267-270.
- An SJ, Choe EO. 2011. Effects of unrefined vegetable oil addition on the flavor acceptability and oil oxidation of tuna oil enriched emulsion under singlet oxygen. *Food Sci. Biotechnol.* **20**: 743-750.
- Anandakumar S, Joseph JA, Bethapudi B, Agarwal A, Jung EB. 2014. Anti-inflammatory effects of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract on acute and chronic inflammation models. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **43**: 612-617.
- Babcock TA, Helton WS, Hong D, Espat NJ. 2002. Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF-alpha production. *Surg. Infect.* **3**: 145-149.
- Byun SH, Yang CH, Kim SC. 2005. Inhibitory effect of *Scrophulariae radix* extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Korean J. Herbol.* **20**: 7-16.
- Camuesco D, Comalada M, Concha A, Nieto A, Sierra S,

- Xaus J, Zarzuelo A, et al. 2006. Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin. Nutr.* **25**: 466-476.
8. Cha JH, Lim EM. 2014. Effects of *Gardeniae fructus* on cytokines in mouse macrophage. *J. Korean Obstet. Gynecol.* **27**: 1-16.
 9. Cho HJ, Shim JH, So HS, Yoon JH. 2012. Mechanism underlying the anti-inflammatory action of piceatannol induced by lipopolysaccharide. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 1226-1234.
 10. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **8**: 18-30.
 11. Din JN, Newby DE, Flapan AD. 2004. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *BMJ.* **328**: 30-35.
 12. Han MH, Lee MH, Hong SH, Choi YH, Moon JS, Song MK, et al. 2014. Comparison of anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their mixtures in RAW 264.7 murine macrophages. *J. Life Sci.* **24**: 329-335.
 13. Hibi M, Nakajima T, Hirano T. 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.* **74**: 1-12.
 14. Jung HK, Kang BM, Jang JH, Ahn BK, Yeo JH, Jung WS, et al. 2014. Inhibitory effect of *Alopecurus aequalis* sobol ethanol extracts on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **22**: 98-104.
 15. Kang CH, Choi YH, Choi IW, Lee JD, Kim GY. 2011. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression by aqueous extract of *Orixa Japonica* in RAW 264.7 cells via suppression of NF- κ B activity. *Trop. J. Pharm. Res.* **10**: 161-168.
 16. Khair-El-Din T, Sicher SC, Vazquez MA, Chung GW, Stallworth KA, Kitamura K, et al. 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.
 17. Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin DJ, et al. 2006. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur. J. Pharmacol.* **545**: 192-199.
 18. Kim KH, Choi MW, Lim SY. 2013. Effect of tuna extract on production of nitric oxide and inflammatory cytokines. *Korean J. Food Sci. Technol.* **45**: 385-390.
 19. Kim MS, Jeong JS, Lee HY, Ju YS, Bae GS, Seo SW, et al. 2011. The anti-inflammatory effect of *Achyranthes japonica* on lipopolysaccharide-induced inflammatory activity in murine macrophages. *Korean J. Herbol.* **26**: 51-57.
 20. Kim S, Kang S, Choi H. 2005. Effects of dietary levels of corn and tuna oils on the formation of preneoplastic lesions in rat hepatocellular carcinogenesis. *Korean J. Nutr.* **38**: 20-29.
 21. Kim SY, Jo MJ, Hwangbo M, Back YD, Jeong TY, Cho IJ, et al. 2013. Anti-inflammatory effect of *Stevia rebaudiana* as a results of NF- κ B and MAPK inhibition. *J. Korean Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **26**: 54-64.
 22. Kim WK, Lee KA, Kim SH. 1996. Effects of perilla oil and tuna oil on lipid metabolism and eicosanoids production in rats. *Korean J. Nutr.* **29**: 703-712.
 23. Lawrence T, Gilroy DW, Colvile-Nash PR, Willoughby DH. 2001. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nat. Med.* **12**: 1291-1297.
 24. Lee HJ, Lee CW, Choi MS, Son DJ, Hong JT. 2006. Effects of esthetic essential oils on LPS-induced nitric oxide generation in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **32**: 111-116.
 25. Lee SA, Kim HJ, Chang KC, Baek JC, Park JK, Shin JK, et al. 2009. DHA and EPA down-regulate COX-2 expression through suppression of NF- κ B activity in LPS-treated human umbilical vein endothelial cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **13**: 301-307.
 26. Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 342-348.
 27. Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Lo R, Helton S. 1999. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF κ B activity. *J. Surg. Res.* **82**: 216-221.
 28. Masaki M, Matsushita M, Wakitani K. 1998. Inhibitory effect of JTE-522, a novel prostaglandin H synthase-2 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis and bone changes in rats. *Inflamm. Res.* **47**: 187-192.
 29. Nauroth JM, Liu YC, Van Elswyk M, Bell R, Hall EB, Chung G, et al. 2010. Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA-n-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells in vitro and paw edema vivo. *Lipids* **45**: 375-384.
 30. OECD guideline for testing of chemicals, test no. 420: acute oral toxicity – fixed dose procedure by Organization for economic cooperation and development (OECD). 2001. Cited October 2014, Awarable from http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en
 31. Park JS, Lee EJ, Lee JC, Kim WK, Kim HS. 2007. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF- κ B and ERK signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **7**: 70-77.
 32. Park YM, Won JH, Yun KJ, Ryu JH, Han YN, Choi SK, et al. 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- κ B in RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 985-990.

33. Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssonen K, Lakka TA, Salonen JT. 2000. Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events. *Circulation* **102**: 2677-2679.
34. Rocca B, FitzGerald GA. 2002. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int. Immunopharmacol.* **2**: 603-630.
35. Ronette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. 2004. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin. Nutr.* **23**: 139-151.
36. Ryu IH, Cho HB, Kim SB, Seo YJ, Choi CM. 2011. The inhibitory effect of *Picrasmae lignum* on inflammatory responses. *J. Orient. Obstet. Gynecol.* **24**: 1-14.
37. Seybold VS, Jia YP, Abrahams LG. 2003. Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain* **105**: 47-55.
38. Shew RL, Papka RE, McNeill DL, Yee JA. 1993. NADPH-diaphorase-positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction. *Peptides* **14**: 637-641.
39. Shimada YJ, Sugihara A, Nakano H, Kuramoto T, Nagao T, Gemba M, *et al.* 1997. Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**: 97-101.
40. Simopoulos AP. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 438-463.
41. The standard of toxicity test of pharmaceutical products: notification of Korea Ministry of Food and Drug Safety under the title of 2014-136. Cited December 2014. Available from <http://www.mfds.go.kr/index.do?x=0&searchkey=title:contents&mid=1013&searchword=%B5%B6%BC%BA&y=0&division=&pageNo=1&seq=8199&cmd=v>.
42. Towbin H, Pignat W, Wiesenberg I. 1995. Time-dependent cytokine production in the croton oil-induced mouse ear oedema and inhibition by prednisolone. *Inflamm. Res.* **44**: 160-161.
43. Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, Hurley LA, Roche HM. 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.
44. Yamagata K, Tagami M, Takenaga F, Yanori Y, Nara Y, Itoh S. 2003. Polyunsaturated fatty acids induce tight junctions to form in brain capillary endothelial cells. *Neuroscience* **116**: 649-656.
45. Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH. 2004. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**: 71-78.