

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포와 마우스 귀 조직에 대한 참도박 (*Grateloupia elliptica* Holmes) 에탄올 추출물의 항염증 효과

배난영¹ · 김민지² · 김꽃봉우리² · 안나경¹ · 최연욱¹ · 박지혜¹ · 박선희¹ · 안동현¹

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract from *Grateloupia elliptica* Holmes on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells and Mice Ears

Nan-Young Bae¹, Min-Ji Kim², Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Na-Kyung Ahn¹,
Yeon-Uk Choi¹, Ji-Hye Park¹, Sun-Hee Park¹, 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 ethanol extract from *Grateloupia elliptica* Holmes (GEHEE) on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response. Anti-inflammatory effects were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, and immunohistochemistry. There were no cytotoxic effects on proliferation of macrophages treated with GEHEE compared to the control. GEHEE remarkably suppressed NO and pro-inflammatory cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β) production and reduced expression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and nuclear factor- κ B (NF- κ B) proteins in a dose-dependent manner. GEHEE also significantly reduced activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). The formation of edema in mouse ears was reduced at the highest dose compared to the control. GEHEE also reduced dermal thickness and mast cell numbers based on histological analysis. These results suggest that GEHEE exerts significant anti-inflammatory activity via inhibition of NF- κ B and MAPKs activation and may be a potential anti-inflammatory therapeutic material.

Key words: *Grateloupia elliptica* Holmes, anti-inflammatory activity, NF- κ B, MAPKs, ear edema

서 론

면역이란 감염에 저항하고 싸우는 개체의 능력을 말하는 것으로 외부나 내부의 위험요소에 대한 방어기전을 의미한다. 그중 염증반응은 외부로부터의 손상이나 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나이며 손상된 부위를 원상으로 회복시키려는 일련의 면역 보호 작용으로 몸의 어떤 부분이 불어지면서 붓고 열이나 통증이 나타나고 과도하게 반응할 시에는 기능장애와 같은 조직변질 순환장애와 조직증식을 유발한다(1). 염증반응이 일어나게 되면 다량의 초기 염증반응 유도 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)이나 염증매개물질들에 의해 혈관 내피세포에 세포 접합 분자의 발현을 증가시킨다(2). 염증인자는 염증자극에 반응하여 세포

내 신호전달 경로와 전사인자가 활성화되며 발현되게 되는데 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 일차적인 자극에 의해 발생된다(3). 이에 대표적인 것이 nuclear factor- κ B(NF- κ B) 또는 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)를 통한 경로이다. 이러한 경로를 통해 발생하는 염증이 치유되지 않고 만성으로 진행될 경우에는 조직손상이 이루어지고 일부에서는 암 발생 등의 질환까지 유발되기도 한다(4).

이와 같은 염증성 질환은 최근 산업화, 도시화로 각종 유해인자에 노출되면서 다양한 연령층에서 크게 증가하고 있는 실정이다. 이를 해결하기 위해 현재 사용되고 있는 합성 항염증제는 일시적으로 증상을 완화하나 과량 사용 시 위궤양이나 위염, 심장혈관질환 등과 같은 부작용이 심각하여 여러 천연물 및 식품 추출물을 이용한 독성이 적은 염증성 질환의 치료제 및 치료보조제의 개발에 대한 연구가 진행되고 있다. 최근 밝혀진 천연물의 항염증 효과 연구로는 왕취뽕나무잎(5), 산유자 잎(6), 발아녹두(7), 소태나무 잎(8) 등 육상식물이 주를 이루고 있어 해양생물의 항염증에 관한 연구가 부족한 실정이다.

Received 9 June 2015; Accepted 22 July 2015

Corresponding author: Dong-Hyun Ahn, Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
E-mail: dhahn@pknu.ac.kr, Phone: +82-51-629-5831

참도박(*Grateloupia elliptica* Holmes)은 홍조류 지누아릿과로 해안의 바위틈에 뭉쳐나고 풀이나 접촉제를 만드는 재료로 쓰이며 한국, 일본 등지에 분포하는 해조류이다. 참도박에 관한 연구로는 항비만(9), 혈액 항응고(10), 항산화(11), 탈모방지(12) 등의 일부 연구가 진행되어 있다. 본 연구에서는 참도박 에탄올 추출물이 LPS로 자극한 대식세포에서 NF-κB와 MAPKs의 활성 저해를 통해 나타내는 항염증 효과를 연구함으로써 참도박 에탄올 추출물을 염증치료제로서 개발의 발판을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 참도박(*Grateloupia elliptica* Holmes)은 부산 연화리에서 채취한 것으로 담수로 깨끗하게 수세한 후 동결건조 하여 분말화하고 진공 포장상태로 -20°C에서 저장하며 사용하였다.

참도박 추출물 제조

분말상태의 참도박은 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 10배 양의 95% ethanol에서 24시간 추출하였으며, 추출물은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)로 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 남은 잔사는 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였고 상층액은 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

실험동물

마우스 귀 조직 관찰 실험에서 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스를 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며 마우스는 온도 20±2°C, 습도 50±10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 부경대학교 동물 실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 수행하였다.

세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등(13)의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cells/mL의 농도로 96-well plate에 분주하고

20시간 전 배양하여 참도박 에탄올 추출물(GEHEE)을 농도별(0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL)로 첨가한 후 22시간 전 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하고 2시간 재 배양하였다. 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co.) 하여 상층액을 걸어내고 dimethyl sulfoxide 100 µL 분주하여 생성된 formazan을 녹여내 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다. 세포 증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

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

Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess 반응(14)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 2.5×10⁵ cells/mL로 조절한 후 24-well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 그 후 GEHEE를 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL 처리하고 1 µg/mL의 LPS로 자극하여 24시간 전 배양하였다. 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co.) 하여 상층액을 얻어 정량 실험에 사용하였다. 상층액은 Griess 시약(1% sulfanilamide+ 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)과 1:1로 상온에서 10분간 반응시켜 microplate reader(Model 550, Bio-Rad)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

Pro-inflammatory cytokines 분비량 측정

RAW 264.7 세포의 세포배양액 내의 tumor necrosis factor receptor-α(TNF-α), interleukin(IL)-6 및 IL-1β cytokine의 분비량은 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 세포배양액을 얻기 위해 RAW 264.7 세포를 2.5×10⁵ cells/mL로 조절하여 24-well plate에 접종하고 18시간의 전 배양 후 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL 농도별 GEHEE와 1 µg/mL의 LPS를 처리하였다. 그 후 12시간의 전 배양을 거쳐 원심분리(UNION 32R, Hanil Co.)를 통해 상층액을 얻었다. ELISA는 microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF-α, IL-6를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating 시켰다. 이후 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였으며, PBST로 세척한 뒤 각 microplate well에 세포 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 PBST로 세척하고 희석한 biotinylated anti-mouse TNF-α, IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase con-

jugate를 분주하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBST로 세척하고 OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 micro-plate reader(Model 550, Bio-Rad)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량 측정

GEHEE가 세포질 내 생성되는 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후, Sheeba와 Asha(15)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, 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)를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질을 정량하였으며 30 μ L의 lysate를 Laemmli(16)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등(17)의 방법을 참고하여 polyvinylidene difluoride membrane(Bio-Rad)에 1시간 동안 전사시켜 5% skim milk가 포함된 tris buffered saline(TBSS, pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking 하였다. iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현량을 검토했기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정하였다. 2차 항체로 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 다음 TBSS로 3회 세정하여 ECL 기질과 1~3분간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool (GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다.

MAP kinase(JNK, ERK, p38) 발현량 측정

MAPKs의 발현량을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 1 \times 10⁶ cells/mL로 18시간 전 배양하고 GEHEE를 처리하여 30분 동안 본 배양한 후 iNOS, COX-2 및 NF- κ B와 동일한 방법으로 이후의 실험을 진행하였다. 인산화된 c-Jun N-terminal kinase(JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK), p38 protein kinase(p38)의 발현량을 검토했기 위하여 anti-mouse JNK, ERK 및 p38(Cell Signalling Technology Inc., Denvers, MA, USA) 항체를 1:5,000으로 희석하여 사용하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

In vitro 상에서 알아본 GEHEE의 항염증 효과를 *in vivo* 상에서 알아보기 위하여 Kim 등(18)과 Saraiva 등(19)의 방법에 의거하여 귀 부종 측정 실험을 실시하였다. 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스에 GEHEE를 10, 50 및 250 mg/kg·body weight 농도로 200 μ L씩 경구 투여하고 1시간 후 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 μ L/ear 농도로 도포하였다. 도포 5시간 후 귀 두께를 측정하였고 croton oil의 처리로 귀 두께가 증가한 것을 부종의 형성으로 간주하였다. 귀 조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 참도박 에탄올 추출물을 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-eosin과 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

$$\text{Edema formation (\%)} = \frac{\text{Sample의 귀 두께}}{\text{Control의 귀 두께}} \times 100$$

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

세포독성 측정

세포독성 측정에 이용된 RAW 264.7 cell 대식세포는 그람 음성균의 내독소인 LPS와 같은 외부자극에 의해 다양한 염증 유발 인자를 분비하여 염증반응을 일으키는 주요세포이다(20). 참도박 에탄올 추출물을 농도에 따라(0.1, 1, 10, 50 및 100 μ g/mL) RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 세포 생존의 변화 여부를 MTT assay를 이용해 측정한 결과 아무 것도 처리하지 않은 음성대조군과 비교 시 차이가 없음을 확인하였다(Fig. 1). 이를 통해 참도박 에탄올 추출물은 0.1~100 μ g/mL에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 독성이 없는 것으로 사료된다.

NO 생성 억제 효과

NO는 인체 내 생리적이거나 병적인 반응에서 중요한 물질로서 적절한 수준에서는 혈소관 억제, 면역조절, 신경전달, 혈관확장 등의 역할을 하지만 과도한 NO의 증가는 면역질환을 포함한 관절염, 기관지염, 다발성 경화증과 같은 병적 반응을 일으킨다(21,22). 본 연구에서는 참도박 에탄올 추출물의 NO 생성 억제 효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증 반응을 유발한 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성량을 Griess 시약을 이용해 측정하였다. 그 결과 LPS를 처리하였을 때와

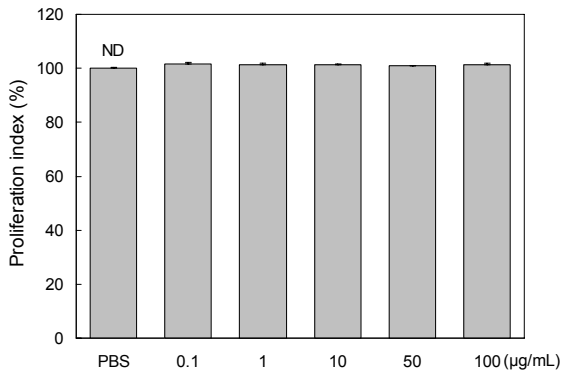


Fig. 1. Effect of *Grateloupia elliptica* Holmes ethanol extract (GEHEE) on the proliferation of RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of GEHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h. Cell proliferation was determined by MTT assay. Proliferation index (%)=(sample O.D./ control O.D.)×100. ND: not significantly different.

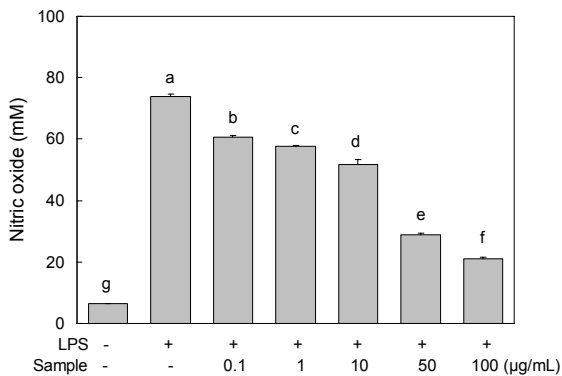


Fig. 2. Inhibitory effect of *Grateloupia elliptica* Holmes ethanol extract on the production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) alone or in combination with GEHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure NO level. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

비교하여 농도 의존적으로 분비량을 유의성 있게 감소시킨 것을 확인하였다(Fig. 2). 특히 50 µg/mL에서 62% 이상의 억제 효과를 나타냈다. 본 연구 결과는 미역 물 추출물이 농도 의존적으로 NO 분비량의 감소를 보인 결과(23)와 잔가지 물 추출물의 NO 저해능을 확인한 연구 결과(24)와 유사함을 확인하였다. 따라서 GEHEE는 LPS로 유도된 대식 세포에서 증가된 NO의 분비 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Pro-inflammatory cytokines 생성 억제 효과

LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 GEHEE를 농도별로 처리하여 pro-inflammatory cytokine(IL-6, TNF-α 및 IL-1β)의 분비량 변화를 ELISA kit을 이용하여 정량하였다. 과도한 pro-inflammatory cytokine의 분비량 증가는 전신성 염증반응 증후군, 폐혈증 및 심한 조직 손상을 야기한다(25). TNF-α는 염증반응 과정 중 초기 주요 내인성 매

개자로 염증 부위로의 백혈구를 증가시키는 다른 염증성 cytokine과 내피세포 부착 분자의 발현이 증가되어 T 세포와 대식세포를 활성화시켜 자가 면역 반응을 발생시키기 때문에 지속적인 염증반응에 있어 주요한 cytokine이다(26). IL-6는 항염증과 염증반응의 두 가지 기능을 가지고 있는 cytokine으로(27) TNF-α와 IL-1β 발현 증가에 의해 발생되는 것으로 알려져 있어 염증질환 반응에서 주요 인자로 작용하며 염증반응에 관여하는 T 세포의 분화를 촉진시킨다(28). 이처럼 TNF-α 및 IL-6는 염증질환에 있어 지표로서 사용되며, 감소된 TNF-α 및 IL-6의 분비량은 항염증제의 효과를 확인하는 데 있어 중요한 요소로 알려져 있다. IL-6의 분비량은 LPS 처리 시 약 123.59 pg/mL로 PBS 처리군과 비교 시 증가하였으며, GEHEE를 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 IL-6의 분비량이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3A). 특히 100 µg/mL 농도에서 92% 이상의 억제 효과를 보였다. 이는 참모자반 에탄올 추출물을 처리한 후 IL-6 분비량을 측정하였을 때 100 µg/mL의 농도에서 80% 이상의 억제 효과를 보인 결과(29)와 유사하다. TNF-α의 경우 농도 의존적으로 분비량이 억제되었는데, 특히 100 µg/mL에서는 60% 이상의 억제 효과를 보임을 확인하였다(Fig. 3B). 또한 IL-1β도 염증반응 조절에서 중요한 cytokine으로 내피세포의 부착분자 발현을 증가시켜 백혈구의 유입을 증가시킨다(30). 다른 cytokine 분비 감소 결과와 마찬가지로 GEHEE는 IL-1β의 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 특히 10 µg/mL에서는 60%, 100 µg/mL 농도에서는 99% 이상으로 감소 효과가 크게 나타났다(Fig. 3C). 따라서 이러한 결과를 종합해볼 때 GEHEE는 pro-inflammatory cytokine인 IL-6, TNF-α, IL-1β 분비 억제를 통해 우수한 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현 억제 효과

iNOS는 대식세포의 자극에 의해 생성되는 물질로 NO를 합성하는 NOS 효소의 한 종류이다. 이는 세포 내에서 L-arginine을 NO로 전환시켜 과량의 NO가 생성되어 염증매개물질로서 염증성 cytokine의 발현을 유도하는 등의 염증 반응을 일으킨다(31,32). NO와 마찬가지로 중요한 염증매개물질인 prostaglandin(PG)은 arachidonic acid가 COX라 불리는 PG synthase 효소의 촉매작용을 받아 형성된다. 2가지 isoform(COX-1, COX-2)으로 존재하는 COX 중 COX-1은 모든 세포에 존재하면서 정상 세포의 항상성을 유지하는 반면, COX-2는 growth factor, cytokine 등 pro-inflammatory agent에 의하여 과대 발현되어 염증뿐 아니라 퇴행성 질환에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(33-35). 이러한 iNOS 및 COX-2는 LPS 자극에 의해 NF-κB가 핵으로 이동함에 따라 염증매개 유전자의 프로모터에 결합하여 발현이 유도된다(36). 따라서 본 연구에서는 iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현의 억제 효과를 관찰하여 앞

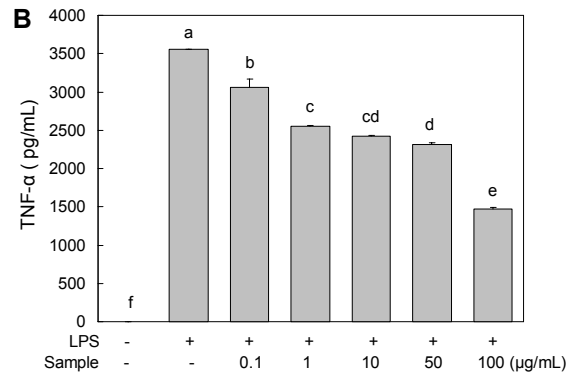
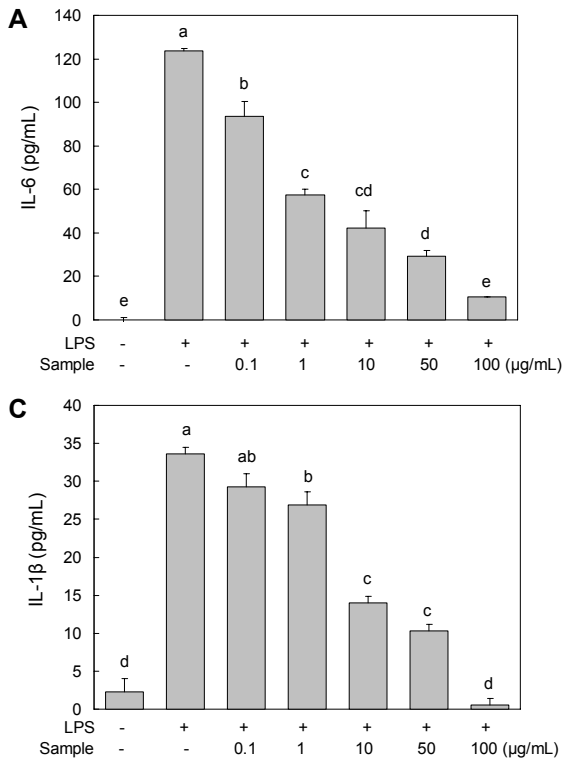


Fig. 3. Inhibitory effect of *Grateloupia elliptica* Holmes ethanol extract on the production of IL-6 (A), TNF-α (B), and IL-1β (C) in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 μg/mL) alone or with various concentrations of GEHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μg/mL). The levels of pro-inflammatory cytokines in the cell culture media were measured by ELISA. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

서 나타난 NO와 cytokines의 억제 효과가 어떠한 pathway에서 작용하여 나타난 결과인지 알아보려고 하였다. GEHEE가 LPS에 의한 iNOS, COX-2 및 NF-κB 단백질 발현 증가에 대한 억제 효과를 western blot을 통해 확인한 결과(Fig. 4) LPS 자극에 의해 급격히 증가한 iNOS, COX-2의 발현량

이 저농도에서는 약간 감소하였으며, 50 및 100 μg/mL 농도로 GEHEE 처리 시 발현량이 크게 감소하였다. 특히 iNOS 및 COX-2에 있어서 GEHEE를 100 μg/mL로 처리 시 약 60% 이상의 억제 효과를 나타내었다. NF-κB의 경우 GEHEE가 농도 의존적으로 유의성 있게 발현량을 감소시켰

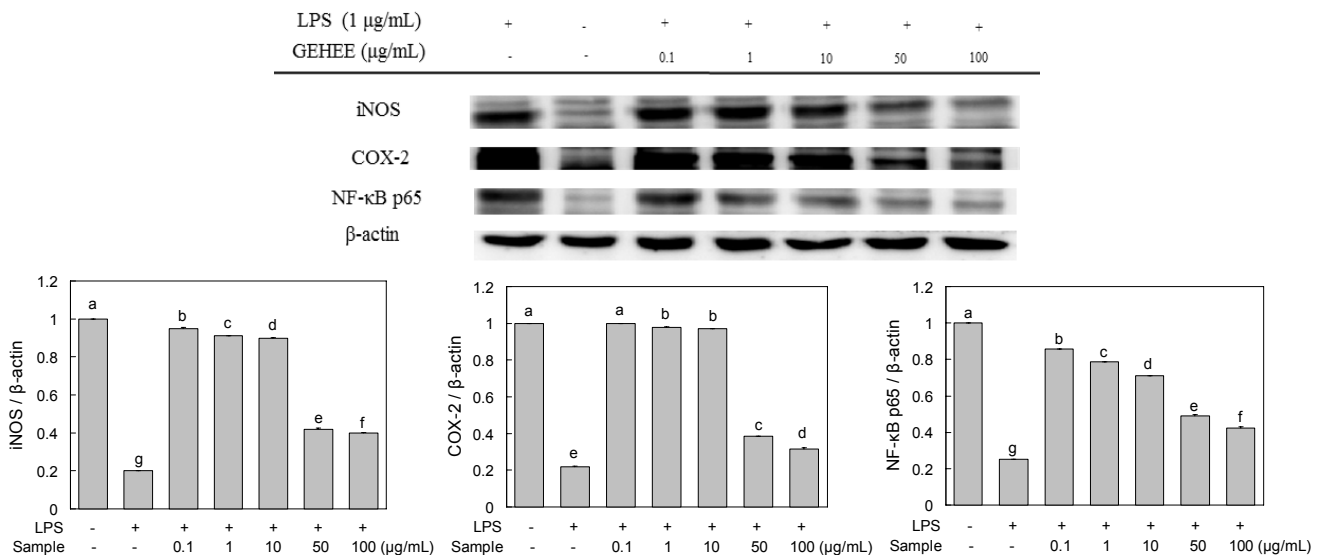


Fig. 4. Effect of *Grateloupia elliptica* Holmes ethanol extract on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF-κB p65 expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of iNOS, COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF-κB in nuclear protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of GEHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μg/mL) and LPS (1 μg/mL) for 18 h or 30 min and the proteins were detected using specific antibodies. For quantification, the expression data were normalized to the β-actin signal. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

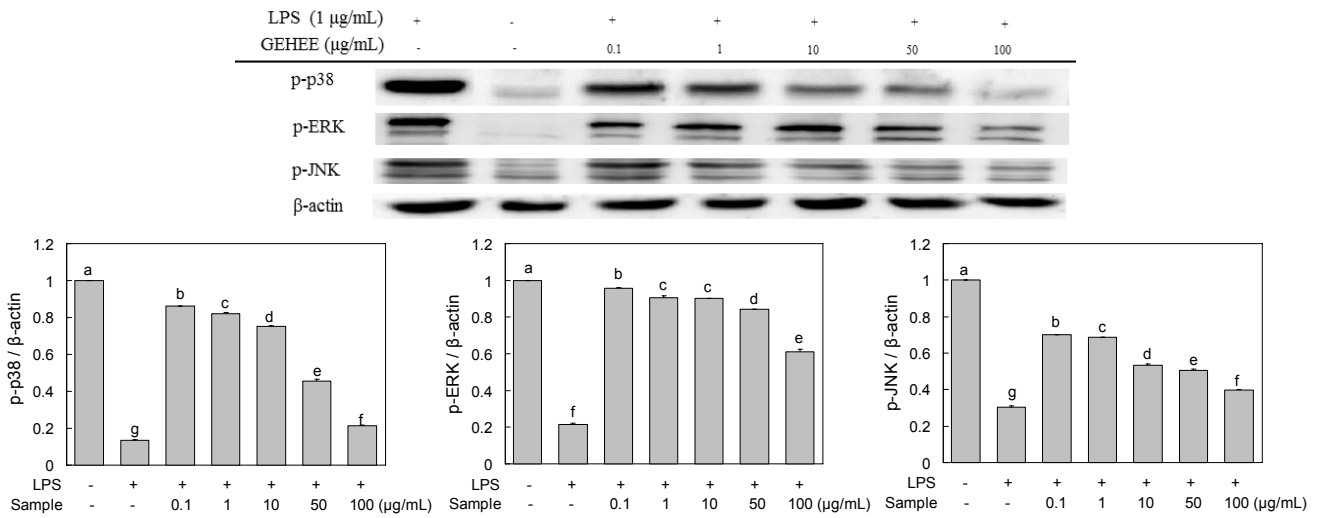


Fig. 5. Effect of *Grateloupia elliptica* Holmes ethanol extract on MAPKs expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of p-p38, p-ERK, and p-JNK in the cytosolic protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of GEHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 30 min, and the proteins were detected using specific antibodies. For quantification, the expression data were normalized to the β -actin signal. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

을 확인하였으며, 비교적 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 50% 이상의 억제 효과를 나타내었다. 따라서 GEHEE가 LPS에 의해 유도된 염증반응에서 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제함에 따라 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함으로써 NO와 cytokine의 분비를 효과적으로 저해한 것으로 사료된다. 이는 애기외톨개 모자반의 항염증 효과에서 NF- κ B 활성화 경로에 의해 iNOS와 염증성 사이토카인의 생성량이 조절됨을 보인 연구 결과와 유사하다(37).

MAP kinase(JNK, ERK, p38) 발현 억제 효과

MAPK는 세포 내 다양한 염증매개인자의 활성화와 영향을 주고받는 NF- κ B의 활성화에 영향을 주는 가장 대표적인 신호분자이다. 포유류에서 이러한 MAPK는 JNK, ERK, p38의 3종이 보고되어 있으며 각 효소의 tyrosine과 threonine 잔기의 인산화에 의해 활성이 조절된다. 그중 JNK의 경우 I κ B kinase의 직접적인 인산화를 통해 NF- κ B를 활성화시켜 염증반응을 일으킨다고 알려져 있다(38). 또한 ERK 및 p38은 iNOS 및 NO 생성 경로에서 주요한 역할을 한다(39,40). GEHEE는 세 가지 MAP kinase에 있어 모두 억제 효과를 나타내었고(Fig. 5), 특히 p38은 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였으며 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 GEHEE를 처리하였을 시 LPS만을 처리한 구에 비하여 약 80%의 억제 효과를 보임을 확인하였다. 또한 p-JNK의 경우 가장 낮은 농도인 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였을 때도 약 30%의 억제 효과를 나타낸 것으로 보아 GEHEE는 염증반응에 있어 뛰어난 억제 효과를 나타낼 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 GEHEE는 대식세포에서 NF- κ B 및 MAPKs의 활성을 억제함으로써 iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine의 발현이 저해되어 항염증 효과를 가지는 것을 알 수 있다.

귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

GEHEE를 10, 50 및 250 mg/kg 농도로 200 μL 씩 경구 투여한 후 croton oil로 염증을 유발하고 귀 두께를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. Croton oil은 피부에 도포하면 즉각적으로 강한 급성 염증반응을 유도하는데(41) 이를 도포한 오른쪽 귀의 두께 차이를 비교하여 염증 유발의 억제 활성을 확인하였다. 그 결과(Fig. 6) 대조군과 비교 시 GEHEE 처리에 의해 유의적으로 귀 두께가 감소하였으며, 250 mg/kg body weight로 처리 시 현재 사용되고 있는 합성 스테로이드제인 prednisolone을 50 mg/kg 농도로 경구 투여했을 때와 유사한 정도의 귀 부종 억제 효과를 나타내었다. 또한 이러한 결과는 조직 관찰 결과와 유사하였는데 조직 관찰 결과(Fig. 7) croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에 GEHEE를 처리하였을 때 prednisolone 처리구와 유사한 정도로 경피 및 진피 두께가 얇아졌으며 toluidine-blue 염

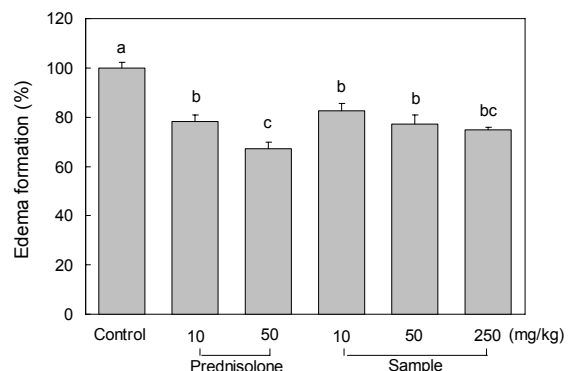


Fig. 6. Inhibition of *Grateloupia elliptica* Holmes ethanol extract against croton oil-induced mouse ear edema (n=5). Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

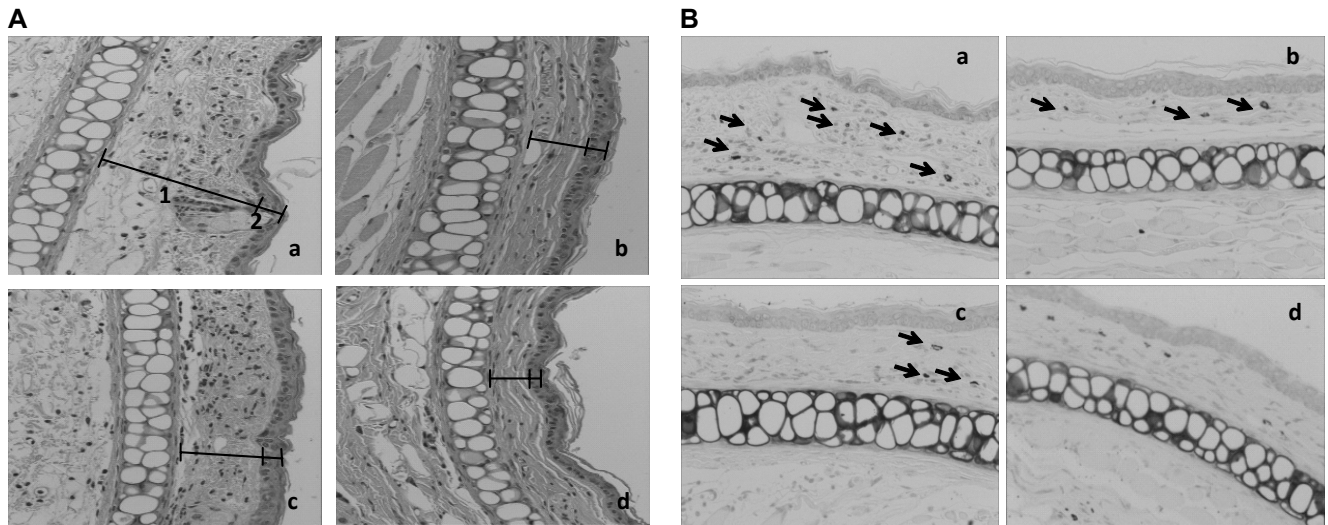


Fig. 7. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of 5% croton oil (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) examined under light microscopy (magnification: $\times 200$). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b), and GEHEE 20 μ L/ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrows indicate mast cells.

색을 통해 확인한 진피에서의 mast cell의 침윤을 GEHEE가 눈에 띄게 억제하였음을 확인하였다. 이는 다시마 뿌리, 외톨개 모자반을 이용한 항염증 효과에서 보인 귀 부종 억제와 조직 관찰에서의 mast cell 침윤 억제 및 경피/진피 두께 감소 결과와 유사하다(42,43). 본 연구 결과를 통해 참도박 에탄올 추출물은 염증질환을 예방하고 치료하는 데 효과적인 항염증 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 참도박 에탄올 추출물(GEHEE)의 항염증 효과를 알아보기 위해 lipopolysaccharide에 의해 활성화된 대식세포로부터 분비되는 염증매개인자들의 발현량과 마우스 모델을 이용한 귀 부종 및 조직학적 관찰 실험을 진행하였다. 그 결과 염증을 유발하는 대표적 물질인 NO 및 사이토카인 [interleukin(IL)-6, IL-1 β 및 tumor necrosis factor receptor- α]의 분비량이 GEHEE 농도 의존적으로 유의적 감소를 보였다. 또한 전사인자인 nuclear factor- κ B의 활성화와 인산화효소인 mitogen-activated protein kinases (p38, JNK 및 ERK)의 발현량이 억제됨을 확인함에 따라 염증작용 기전에서 이들의 활성화 억제가 NO 및 사이토카인 분비량 조절에 영향을 미침을 확인하였다. 동물모델을 이용한 실험에서는 croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에 GEHEE를 처리하였을 때 항염증제인 prednisolone 처리구와 유사한 수준으로 경피 및 진피의 두께가 감소한 것을 확인하였으며, 조직 내 침윤되는 mast cell의 수도 현저히 억제됨을 확인하였다. 따라서 본 연구 결과는 참도박 에탄올 추출물의 항염증 효능을 가진 기능성 소재로의 이용 가능성을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초 연구사업입니다(No. 2012 R1A6A1028677).

REFERENCES

- Willoughby DA. 1975. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis* 34: 471-478.
- Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13: 85-94.
- Miyake K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* 12: 186-192.
- Hofseth LJ, Ying L. 2006. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1765: 74-84.
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1205-1210.
- Lee JY, Ahn EK, Ko HJ, Cho YR, Ko W, Jung YH, Choi KM, Choi MR, Oh JS. 2014. Anti-melanogenic, anti-wrinkle, anti-inflammatory and anti-oxidant effects of *Xylosma congesta* leaf ethanol extract. *J Appl Biol Chem* 57: 365-371.
- Kim ES, Jeong NH. 2014. Anti-inflammatory effect of germinated mung bean and hairdye applications. *J Korean Oil Chemists' Soc* 31: 23-30.
- Jung YS, Eun CS, Jung YT, Kim HJ, Yu MH. 2013. Anti-inflammatory effects of *Picrasma quassioides* (D.DON) BENN leaves extract. *J Life Sci* 23: 629-636.
- Park JC, Jang YI, Doo MS, Kim SH, Choi JW. 1996. Effect of methanolic extract of *Pachymeniopsis elliptica* on lipids component of hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci*

- Nutr* 25: 958-962.
10. Yoon JA, Yu KW, Jun WJ, Cho HY, Son YS, Yang HC. 2000. Purification of blood anticoagulant polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 908-916.
 11. Lee SY. 2002. Studies on the antioxidants from the *Phelinus linteus* and *Grateloupia elliptica*. *MS Thesis*. Hanbat National University, Daejeon, Korea.
 12. Kang JI, Kim SC, Han SC, Hong HJ, Jeon YJ, Kim B, Ko YS, Yoo ES, Kang HK. 2012. Hair-loss preventing effect of *Grateloupia elliptica*. *Biomol Ther* 20: 118-124.
 13. 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- κ B in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 29: 985-990.
 14. 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.
 15. Sheeba MS, Asha VV. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF- α and iNOS expression, which is mediated by NF- κ B regulation, in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 124: 39-44.
 16. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
 17. Towbin H, 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Lee HN, Kim JK, Kwon GT, Shim JH, Kim JD, Yoon Park JH. 2012. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from bark of *Acer barbinerve* maxim. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1242-1247.
 21. Jeong H, Sung M, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. 2012. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 888-894.
 22. Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* 569: 321-326.
 23. Jeong DH, Kim KBWR, Kang BK, Jung SA, Kim HJ, Jeong HY, Bark SW, Ahn DH. 2012. Anti-inflammatory activity of the *Undaria pinnatifida* water extract. *J Appl Biol Chem* 55: 221-225.
 24. Jeong DH, Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of *Sargassum micracanthum* water extract. *J Appl Biol Chem* 57: 227-234.
 25. Hyun TK, Ko YJ, Kim EH, Chung IM, Kim JS. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Ind Crop Prod* 74: 263-270.
 26. Chen X, Miao J, Wang H, Zhao F, Hu J, Gao P, Wang Y, Zhang L, Yan M. 2015. The anti-inflammatory activities of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract and its components in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages through inhibition of NF- κ B pathway. *J Ethnopharmacol* 170: 72-80.
 27. Al-Banna N, Raghupathy R, Albert MJ. 2008. Correlation of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine levels with histopathological changes in an adult mouse lung model of *Campylobacter jejuni* infection. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1780-1787.
 28. Fernando MR, Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM. 2014. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS ONE* 9: e94188.
 29. Jeong DH, Kim MJ, Kang BK, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Ahn NK, Choi YU, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Sargassum fulvellum* on lipopolysaccharide induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells and mice ears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1158-1165.
 30. Li YY, Huang SS, Lee MM, Deng JS, Huang GJ. 2015. Anti-inflammatory activities of cardamonin from *Alpinia katsumadai* through heme oxygenase-1 induction and inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathway in the carrageenan-induced paw edema. *Int Immunopharmacol* 25: 332-339.
 31. Miyasaka N, Hirata Y. 1997. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci* 61: 2073-2081.
 32. Simmons ML, Murphy S. 1992. Induction of nitric oxide from glial cells. *J Neurochem* 59: 897-905.
 33. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. 2003. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 33: 155-167.
 34. Needleman P, Isakson PC. 1997. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl* 49: 6-8.
 35. Seybold VS, Jia YP, Abrahams LG. 2003. Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain* 105: 47-55.
 36. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177: 1779-1784.
 37. Kim B, Kim JI, Kim HR, Byun DS. 2014. Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoii* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor J Fish Aquant Sci* 47: 527-536.
 38. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
 39. Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin DJ, Han SK, Park SM, Park JH, Park HI, Sung JM, Jang Y, Chung N, Hwang KC, Kim TW. 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.
 40. 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 pathways. *Int Immunopharmacol* 7: 70-77.
 41. 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: S160-

- 161.
42. Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Ahn NK, Choi YU, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 46: 729-733.
43. Jeong DH, Kim KB, Kim MJ, Kang BK, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of methanol extract and n-hexane fraction mojabanchromanol b from *Myagropsis myagroides*. *Life Sci* 114: 12-19.