

참모자반 조다당 추출물과 에탄올 추출물의 대식세포 및 비장세포 활성 비교

변 의 홍

공주대학교 식품공학과

Comparison Study of Immunomodulatory Activity of Polysaccharide and Ethanol Extracted from *Sargassum fulvellum*

Eui-Hong Byun

Department of Food Science and Technology, Kongju National University

ABSTRACT The immune system plays an important role in maintaining and protecting human health. In the present study, comparison of immuno-modulatory activities between polysaccharides (SFP) and ethanol (SFE) extracts separated from *Sargassum fulvellum* in macrophages and murine splenocytes were investigated. Immuno-modulatory activities of macrophages were estimated based on cell proliferation, nitric oxide (NO), inducible NO synthase (iNOS), and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells, and lipopolysaccharide was used as a positive control. SFP and SFE treatment did not affect cytotoxicity in RAW 264.7 macrophage cells, and SFP treatment significantly increased NO and cytokine production (TNF- α , IL-6, and IL-1 β), whereas SFE did not contribute to the increase in NO and cytokine production. In the case of splenocytes, SFP treatment increased splenocyte proliferation and also highly increased production of Th-1 type cytokines (IL-2 and IFN- γ) than those of SFE. Through this study, we confirmed that immuno-modulatory activities of *Sargassum fulvellum* may be due to polysaccharide extracts and this can be a potential nutraceutical.

Key words: *Sargassum fulvellum*, polysaccharide, ethanol extracts, immuno-modulatory activity, cytokine

서 론

면역은 항원의 특이성에 따라 선천면역(innate immunity)과 후천면역(adaptive immunity)으로 구분되는데 이는 생체 내에서 자연적으로 발생하거나 외부 인자들에 의해 나타나는 이상 현상을 제거하여 생체의 항상성(homeostasis)을 유지시킨다. 선천면역은 대식세포 및 자연 살해 세포(natural killer cell) 등을 포함하는 백혈구, cytokine 등으로 구성되어 있으며, 외부 인자들에 대한 후천면역이 발생하기 전에 먼저 작용하여 1차 방어 역할을 한다(1). 대식세포가 활성화되면 세포 증식과 확산 능력 향상 등의 형태적 변화와 함께 식균 능력의 증강, nitric oxide(NO) 및 cytokine 생성이 증가하여 최종적으로 암세포와 각종 유해균의 성장을 억제시킬 수 있는 것으로 보고된다(2).

최근 진균류, 효모류, 고등식물, 세균, 곰팡이, 해조류 등 천연 소재에서 분리한 다당체는 효소에 비활성을 나타내고 종양이나 알레르기를 유발하지 않으며 물리, 화학적으로 안정하고 다양한 활성을 가진다고 보고되고 있다(3). 그중 다

당체를 이용한 연구로는 항보체 활성(4), 항종양 활성(5), 식균 작용 증강 활성(6) 등의 면역조절기능과 혈당강하 활성(7) 등의 다양한 약리작용이 보고되고 있어 주목받는 소재로 부상되고 있다.

참모자반(*Sargassum fulvellum*)은 한국, 일본 등 동남아시아 일대에 분포하는 다년생 갈조류 중의 하나로 우리나라 전 해안에 널리 자생하며, 식용으로 이용하는 대표적인 해조류이다. 참모자반에 대한 최근 연구로는 유기용매 분획물의 발암 억제에 관한 연구(8)와 유기용매 추출물의 항균 실험과 열 및 pH에 대한 안정성에 관한 연구(9), 모자반에서 분리한 fucoidan의 혈액 응고 억제 특성에 관한 연구(10), 갈조류 효소적 가수분해물의 항산화 효과에 대한 연구(11,12), 물 추출물(13)과 에탄올 추출물에 대한 항염증 효과에 대한 연구(14) 등이 보고되고 있다. 그러나 참모자반을 소재로 진행된 국내의 연구들은 대부분 유기용매 추출물을 이용하여 다양한 활성을 도출하고 있으며, 이러한 연구 중 참모자반 조다당 추출물 소재로 진행된 연구들은 아직까지 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 참모자반의 조다당 추출물(*Sargassum fulvellum* polysaccharide extract, SFP)과 에탄올 추출물(*Sargassum fulvellum* ethanol extract, SFE)의 면역 활성에 관하여 비교하는 연구를 통하여 참모자반 추출

Received 14 July 2015; Accepted 8 September 2015

Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan, Chungnam 32439, Korea

E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr, Phone: +82-41-330-1481

물의 면역 증강 활성 물질로서의 가능성에 관하여 알아보고자 한다.

재료 및 방법

참모자반 추출

본 실험에서 사용된 참모자반은 경상남도 완도군에서 구입하여 사용하였다. 참모자반을 담수로 2~3회 수세하여 건조한 후 실험용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 분말화하였다. 참모자반 조다당 추출물을 얻기 위하여 참모자반 분말 100 g을 증류수 2 L에 넣고 100 °C에서 2시간 동안 가열하여 추출하였다. 원심분리기(Combi-514R, Hanil)를 이용하여 3,200 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액 300 mL에 에탄올(95% ethanol) 700 mL를 첨가한 뒤 4°C에서 24시간 정치하여 생성된 조다당 침전물을 원심분리(3,200 rpm, 15 min) 한 후 분리하고, 동결 건조하여 조다당 추출물로 사용하였다. 참모자반 에탄올 추출물을 얻기 위하여 참모자반 분말 100 g에 에탄올 2 L를 넣고 상온에서 24시간 동안 교반하여 얻은 추출물을 원심분리한 후 상등액을 취하고, 감압농축기로 농축한 뒤 동결 건조하여 참모자반 에탄올 추출물로 사용하였다.

세포 배양

마우스 유래의 대식세포주인 RAW 264.7 세포주는 한국 세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 본 실험에 사용하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 1% antibiotics(100 unit/mL penicillin and 100 unit/mL streptomycin)가 포함된 roswell park memorial institute(RPMI)-1640 배지(Life Technology, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Thermo, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

세포 증식률 측정

참모자반 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 증식률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 3×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 100 ng/mL의 lipopolysaccharide(LPS)와 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL) SFP 및 SFE를 각각 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 각각의 well에 10 µL 처리하고 2시간 동안 반응시킨 후 배양 상등액을 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co.)를 100 µL씩 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 세포 증식율은 control(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 비교하였다.

NO 분비량 측정

참모자반 추출물의 처리가 NO 분비량에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 48 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 RAW 264.7 세포를 분주하고 100 ng/mL의 LPS와 SFP 및 SFE를 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL)로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 분리된 배양 상등액에서 NO 및 cytokine 함량을 측정하였다. 배양 상등액 100 µL에 동량의 Griess(Sigma-Aldrich Co.) 시약을 넣어 암실에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

대식세포 cytokine 분비능 측정

참모자반 추출물의 처리가 cytokine 분비량에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 100 ng/mL의 LPS와 SFP 및 SFE를 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리된 배양 상등액에서 cytokine(TNF-α, IL-6, IL-1β)의 함량을 측정하였다. Cytokine 함량은 enzyme linked immuno sorvent assay(ELISA) kit(eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cytokine의 농도는 kit에 포함되어 있는 TNF-α와 IL-6의 표준용액(2,000 pg/mL)을 희석하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

대식세포 내 inducible NO synthase(iNOS) 발현 측정

RAW 264.7 대식세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고 SFP를 12.5, 25, 50 및 100 µg/mL의 농도로 처리하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 phosphate-buffered saline으로 3회 세척한 후 NP40 cell lysis buffer(Biosource, Seoul, Korea)를 첨가한 다음 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 해서 cell lysate를 분리하였다. 분리된 cell lysate는 BCA protein detection kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질 정량을 실시하였고, well당 20 µg의 cell lysate를 10% polyacrylamide gel에 각각 loading 하여 SDS-PAGE로 변성 분리하였다. 이를 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)으로 transfer 하였고, membrane은 anti-body의 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution(skim milk 5%) 20 mL에서 1시간 방치하였다. 이후 TBST(20 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며, 세포 내 iNOS의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체(Cell Signaling, Danvers, MN, USA)를 1:2,000으로 희석하여 4시간 동안 반응시키고 TBST로 5분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항체(goat-anti rabbit IgG, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 1:5,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, 현상을 위한

여 electrochemiluminescence(ECL, Merck Millipore) reagent를 사용하여 인화하였다.

마우스로부터 비장세포 추출

본 연구에 사용된 실험동물은 한국원자력연구원 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(KAERI-IACUC-2013-001). 1주간의 순화를 마친 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 비장을 무균적으로 적출하여 10%의 FBS와 항생제 penicillin과 streptomycin(100 unit/mL, 100 µg/mL)을 함유한 RPMI-1640 배지로 세척한 후 tissue grinder(Corning Costar, Corning, NY, USA)로 균질화하여 비장세포를 유리시켰다. 세포현탁액 중 적혈구를 제거하기 위하여 red blood cell(RBC) lysis buffer(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 혈구계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다.

비장세포의 세포 증식능 평가

SFP 및 SFE의 처리가 비장세포의 세포 증식능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 96 well plate에 well당 1×10^6 개의 비장세포를 분주한 후, 3 µg/mL의 Concanavalin(Con) A와 SFP 및 SFE를 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL)로 각각 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 세포배양기에서 24시간 배양한 다음, WST-1[®](Daeil Lap Science, Seoul, Korea) 용액을 각각의 well에 10 µL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 비장세포의 증식능을 평가하였다.

비장세포의 대한 cytokine 분비능 평가

SFP 및 SFE의 처리가 비장세포의 cytokine 분비능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 비장 조직으로부터 분리된 비장세포를 48 well plate에 well당 2×10^6 개씩 분주한 후 3 µg/mL의 Concanavalin(Con) A와 SFP 및 SFE를 각각 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 24시간 동안 반응시키고 배양 상등액에 존재하는 cytokine(IL-2, 4, IFN-γ)의 함량에 관하여 측정하였다. Cytokine의

측정은 ELISA kit(eBioscience)을 사용하여 측정하였다.

통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences(SPSS 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Student's two tailed t-test로 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

참모자반 추출물 SFP 및 SFE의 대식 세포 증식능에 미치는 영향

대식세포는 단핵 포식세포로서 선천면역계를 담당하는 T 세포에 항원을 제시하여 초기 비 적응 면역기인 내재면역에 중요한 역할을 수행하는 면역세포이다(15). 대식세포는 NADPH oxidase와 iNOS에 의해 superoxide anion(O₂⁻)과 NO를 합성하고 cytokine을 분비함으로써 미생물 및 암세포를 죽이거나 감염으로부터 손상된 세포 및 조직을 탐식하여 제거하는 역할을 주로 수행한다(16). 대식세포에 의하여 생산되는 주된 cytokine들로는 interleukin(IL), interferon(IFN), tumor necrosis factor(TNF), 프로스타글란딘(prostaglandin) 등이 있으며, 이들의 생산에 의하여 대식세포의 활성화 여부가 결정된다고 보고된다(17).

본 연구에서는 각기 다른 2종류의 참모자반 추출물의 대식세포(RAW 264.7) 면역 활성 유도능에 미치는 영향에 관하여 평가하기 앞서 SFP와 SFE가 마우스 대식세포 기원의 세포주인 RAW 264.7에 세포독성을 유발하는지에 관하여 알아보았다. 대식세포에 대한 세포 증식능의 평가는 RAW 264.7에 농도별 SFP와 SFE를 처리하여 24시간 동안 방치한 후 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). SFP와 SFE를 각각 농도별(12.5, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리하였을 때 모든 농도에서 세포 증식능의 유의적인 변화가 관찰되지 않은 것으로 보아 SFP 및 SFE의 처리는 대식세포에 대한 세포독성에 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. 따라서

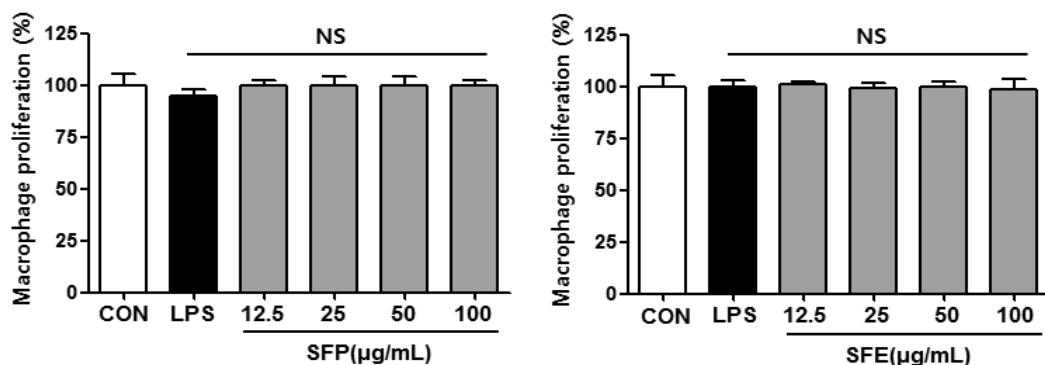


Fig. 1. Cell proliferation activity of *Sargassum fulvellum* polysaccharide (SFP) and ethanol extracts (SFE) in macrophage cell line (RAW 264.7). SFP and SFE were treated at the concentration of 12.5, 25, 50, and 100 µg/mL in RAW 264.7 cells. After 24 h, cell proliferation was evaluated by MTT assay. Results are expressed as the mean±SD (n=3). NS denoted no significance.

상기 세포독성에 영향을 주지 않는 농도에서 SFP 및 SFE의 대식세포 면역 활성화 유도능에 관하여 평가하기 위하여 면역 활성화와 밀접한 관련이 있는 매개체인 NO 및 cytokine의 함량 변화에 관하여 관찰하였다.

참모자반 추출물 SFP 및 SFE의 대식세포 NO 및 iNOS 분비능에 미치는 영향

참모자반 추출물인 SFP와 SFE의 대식세포 면역 활성화 유도능에 관해 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 SFP와 SFE를 농도별로 처리한 후, 세포 배양 상등액에서 NO의 생성에 관하여 알아보았다. RAW 264.7 세포에 SFP와 SFE를 농도별(12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였을 때 NO의 분비능을 Fig. 2에 나타내었다. SFP를 농도별로 RAW 264.7에 처리하였을 경우 2.8 ± 0.7 , 2.9 ± 0.8 , 5.7 ± 1.1 , 9.8 ± 1.3 μM 로 NO 생성이 SFP의 처리 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 대식세포의 mitogen인 LPS의 처리구(100 ng/mL)와 비교할 경우 상대적으로 낮은 NO 생성을 나타내었다. 면역반응의 증감을 판단하기 위하여 NO의 분비능은 매우 중요한 표지인자로 작용한다. 비교적 낮은 농도의 NO의 분비는 면역세포 내의 면역 활성을 유도 및 유지하는 중요한 수단인 nuclear factor(NF)- κ B를 활성화시키고 면역작용을 활발하게 유도시켜 면역조절자(immunomodulator)로서 인식이 되지만, 높은 농도의 NO 분비는 오히려 NF- κ B의 활성을 막아 면역반응을 억제시켜 면역 독성 물질(immunotoxin)로서 작용한다고 보고된다(18). 본 연구에서는 SFP의 처리에 따라 NO의 분비능이 촉진되는 것으로 관찰되었지만, 양성 대조구로 처리한 LPS

처리구와 비교하였을 때 그 증가가 상대적으로 낮은 것으로 보아 SFP의 처리는 면역조절자로서 NO의 분비능을 증가시키는 것으로 사료된다. 또한 SFP의 처리에 따라 iNOS의 발현 또한 증가되는 것으로 보아 NO 분비능의 증가는 세포 내 iNOS 발현의 증가의 영향에 따른 것으로 사료된다.

반면 SFE를 처리한 경우 대식세포의 NO 생성에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 보아 참모자반 추출물의 면역 활성화는 참모자반 다당류 추출물에서 매우 높게 유지되는 것을 알 수 있었다.

인체 면역 반응에서 항상성 유지를 위하여 중요한 역할을 수행하는 NO는 저분자량의 막-투과성 기체이며, 세포 내의 산화질소 합성효소(NOS: nitric oxide synthase)에 의해 아미노산 L-arginine과 산소 분자가 L-citrulline과 NO로 전환되는 과정에 의하여 생성되며(19,20), 인체 내에서 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양의 생성을 억제하고 각종 면역 신호전달기전을 조절하며 신경독성 완화, 혈관 확장 등 다양한 생리적 기능을 수행한다(21). 따라서 대식세포에 의한 NO 유도 분비능의 평가는 면역 활성화 평가를 위한 척도로 현재 다양하게 적용되고 있는 실정이다. 본 연구에서도 참모자반 다당류 추출물 및 에탄올 추출물의 면역 활성화에 관하여 비교하기 위하여 농도별 SFP 및 SFE를 처리한 결과 SFP 처리구에서 NO의 유도 분비능이 유의적으로 증가되는 것을 알 수 있었고, 이러한 NO 분비능의 증가로 미루어 보아 참모자반 다당류 추출물이 면역조절자로서 면역 활성화에 매우 효과가 있을 것으로 사료되며, 보다 면밀한 분석을 위하여 SFP 및 SFE의 cytokine 분비능에 관하여 관찰하였다.

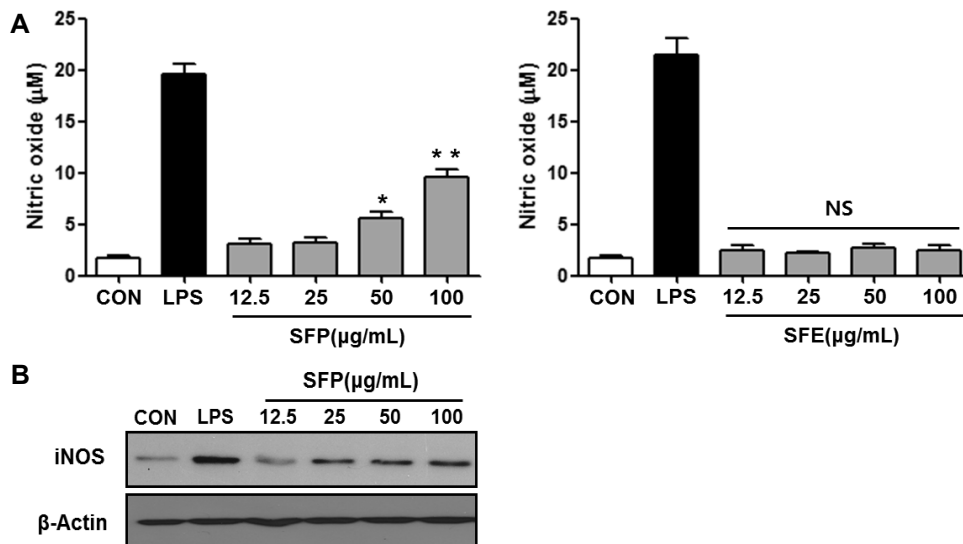


Fig. 2. Nitric oxide (NO) production activity and inducible NO synthase (iNOS) expression of *Sargassum fulvellum* polysaccharide (SFP) and ethanol extracts (SFE) in macrophage cell line (RAW 264.7). SFP and SFE were treated at the concentration of 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ in RAW 264.7 cells. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 100 ng/mL as a specific mitogen to macrophage cells. After 24 h, NO production in culture supernatant was estimated by Griess reagent assay (A) and iNOS expression in cell lysate was investigated by western blotting (B). Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails t-test with a significant level of * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to control (CON) group. NS denoted no significance.

참모자반 추출물 SFP 및 SFE의 대식세포 cytokine 분비능에 미치는 영향

면역세포에서 분비하는 cytokine은 면역반응의 연결자로서 미생물 등의 외부 항원에 대한 여러 면역세포 간의 협력을 조절하므로 이들의 생성과 분비는 면역반응의 조절에 있어서 매우 중요한 역할을 수행한다. 대식세포가 분비하는 대표적인 cytokine에는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등이 있으며, 이들 중 TNF- α 는 대식세포의 활성화에 기인하고 tumor cell에 대한 강력한 세포독성을 나타내기도 하지만 외부 자극에 의하여 그 양이 지나치게 많아지면 급성 및 만성 염증을 일으킨다고 보고되었다(22,23). IL-6는 면역반응, 조혈작용과 염증을 조절하는 데 관여하는 cytokine으로 plasma cell 분화를 유도하여 B림프구의 항체 생성을 활성화시키며, 면역글로불린의 합성에 관여하고 다른 cytokine과 협력하여 상승작용을 나타내는 등 다양한 작용을 한다고 알려져 있다(24). 또한 이러한 cytokine들은 직접적으로 선천면역계를 활성화시킬 뿐만 아니라 간접적으로 T세포 관련 후천면역계를 자극시켜 숙주의 면역반응에 중대한 촉매로서의

역할을 수행한다고 보고되었다(25). 따라서 본 연구에서도 참모자반 추출물인 SFP 및 SFE의 면역 활성 효과에 관하여 확인하기 위하여 대식세포에 이들을 처리하여 대식세포가 분비하는 cytokine의 함량에 관하여 평가하여 보았다.

SFP 및 SFE의 대식세포 cytokine 분비 유도능을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 SFP와 SFE를 농도별(12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 후 세포 배양 상등액에서 cytokine(TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 함량을 ELISA법으로 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 SFP 처리구에서 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 함량이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 반면 SFE 처리구는 처리 농도 의존적으로 cytokine 함량에 변화가 나타나지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과로 미루어 보아 앞선 NO 분비 유도능 결과와 유사하게 대식세포 cytokine 유도능 또한 참모자반 다당류 추출물인 SFP 처리구에서 높게 나타나는 것으로 관찰되었으며, 향후 선천면역계를 담당하는 대식세포뿐만 아니라 후천면역계를 담당하는 비장세포에서 SFP 및 SFE의 면역 활성 유도 효과에 관하여 관찰해 보았다.

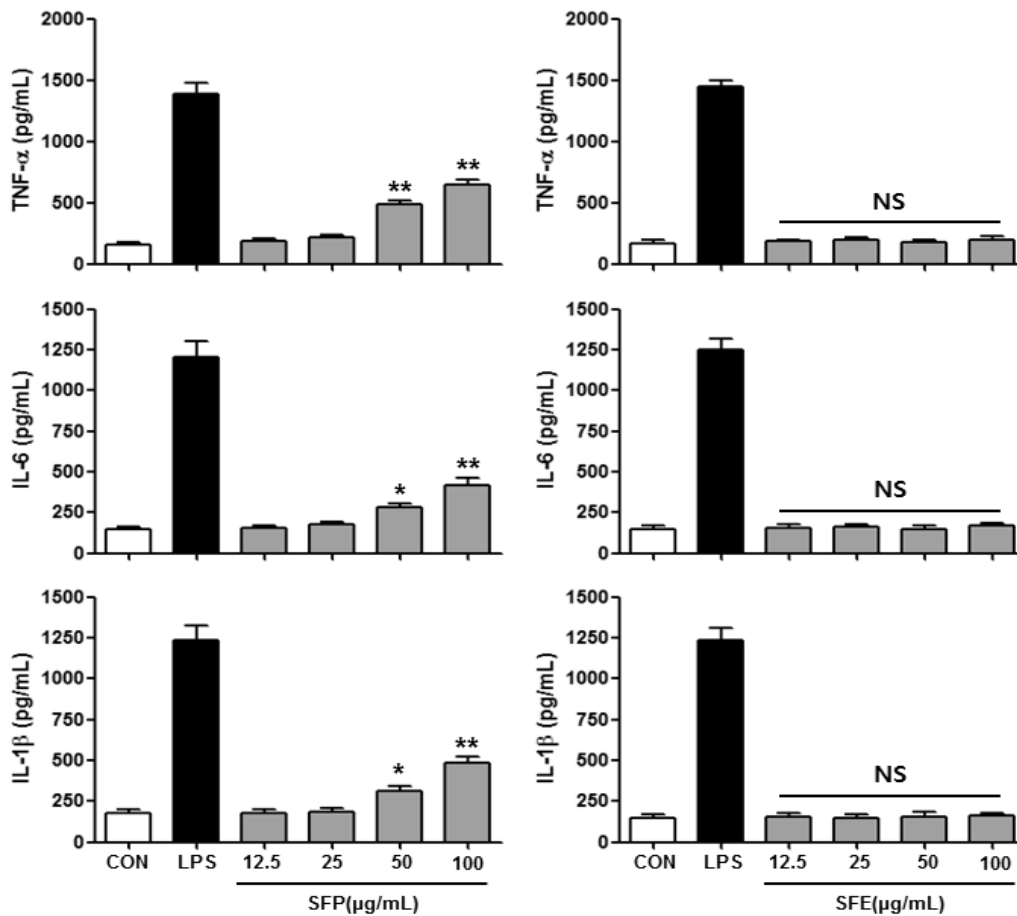


Fig. 3. Cytokine (TNF- α , IL-6, and IL-1 β) production activity of *Sargassum fulvellum* polysaccharide (SFP) and ethanol extracts (SFE) in macrophage cell line (RAW 264.7). SFP and SFE were treated at the concentration of 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in RAW 264.7 cells. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 100 ng/mL as a specific mitogen to macrophage cells. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails t-test with a significant level of * P <0.05, ** P <0.01 compared to control (CON) group. NS denoted no significance.

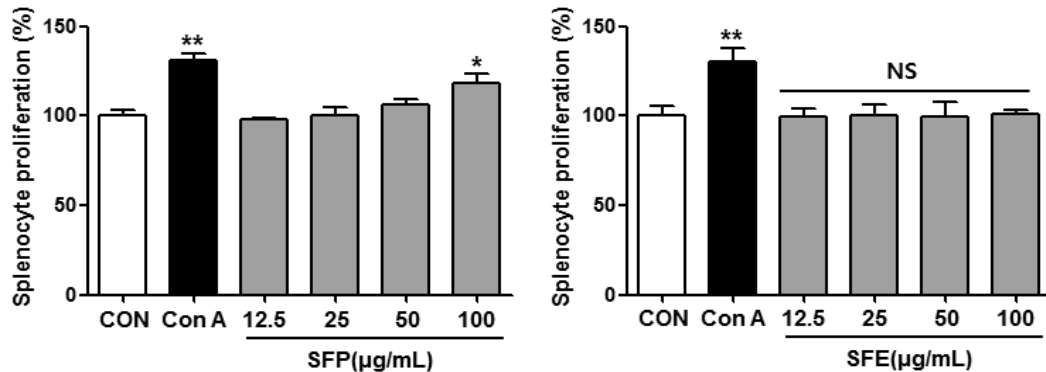


Fig. 4. Cell proliferation activity of *Sargassum fulvellum* polysaccharide (SFP) and ethanol extracts (SFE) in splenocyte separated from mouse spleen. SFP and SFE were treated at the concentration of 12.5, 25, 50, and 100 µg/mL in splenocyte. Concanavalin (Con) A was also treated at the concentration of 3 µg/mL as a specific mitogen to splenic T cells. After 24 h, cell proliferation was evaluated by WST-1 assay. Results are expressed as the mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails t-test with a significant level of * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared to control (CON) group. NS denoted no significance.

참모자반 추출물 SFP 및 SFE의 비장세포 증식률에 미치는 영향

체내에서 비장(spleen)은 혈액에서 유래되는 항원에 대한 주된 보호 면역 반응을 담당하는 장기로 B 및 T 림프구의 성숙과 항원의 자극에 의한 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프 기관이다. 따라서 비장 내 림프구의 증식은 면역 시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다(26). 특히 비장 세포는 면역 반응과 밀접한 관련을 나타내며, 그 크기나 수가 직접적인 지표로 이용될 수 있어 대표적인 면역지표로 사용된다(27). 본 연구에서도 참모자반 추출물인 SFP 및 SFE의 면역 활성 효과를 비교하기 위하여 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하고, 적출된 비장으로부터 비장세포를 분리한 후 참모자반 추출물을 처리하여 비장세포의 세포 증식률에 미치는 영향에 관하여 평가하였다(Fig. 4).

SFP 및 SFE를 비장세포에 농도별(12.5, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리한 결과 SFE 처리구에서는 세포독성에 영향을 미치지 않으나 처리 농도별 비장세포의 증식을 증가시키지 않는 것으로 관찰되었으며, SFP 처리구에서는 비장세포의 증식능이 증가되는 것으로 관찰되었다(Fig. 4). 따라서 참모자반 추출물인 SFP는 선천면역계를 대표하는 대식세포의 활성을 유도할 뿐만 아니라 후천면역계에서 중요한 역할을 수행하는 비장세포의 증식을 도와 비장세포의 면역 활성에 크게 기여할 것으로 판단이 되며, 보다 면밀한 실험을 위하여 비장세포에 다수 포함되어 있는 면역 T세포가 분비하는 cytokine에 관하여 Th1 type과 Th2 type으로 나누어 평가하여 보았다.

참모자반 추출물 SFP 및 SFE의 비장세포 cytokine 분비능에 미치는 영향

비장세포의 활성화가 일어나면 여러 종류의 면역반응을 매개하는 cytokine을 분비하게 된다. 비장세포에서 분비되는 대표적인 cytokine으로는 IL-2, 3, 4, 5, 6, 10, 13과 IFN- γ 및 TNF- α 등이 있으며, 이들 중 IFN- γ 는 병원성 미생물

의 침입에 대항하여 숙주를 방어할 수 있는 세포활성 물질이며, IL-2는 항원 및 mitogen과 결합하여 B 세포, NK 세포 및 대식세포의 증식을 조절하는 인자로 세포 매개 면역반응에서 중요한 역할을 한다(28). 따라서 IFN- γ 및 IL-2 cytokine의 유도 분비능 측정은 비장세포 면역 활성 여부를 판단하는 매우 중요한 지표로 알려져 있다(25). 면역 T 세포는 cytokine과 일부 전사인자(transcription factor)들의 활성화에 의하여 Th1 세포와 Th2 세포로 분화하며 각각의 세포에서 분비되는 cytokine의 경우 면역증강 유도 및 알레르기 유발에 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다(29). Th1 세포가 분비하는 대표적인 cytokine으로는 IL-2, IFN- γ , TNF- α 등이 있고, Th2 세포가 분비하는 대표적인 cytokine으로는 IL-4, 5, 10, 13이 있으며, 특히 Th1 세포가 분비하는 cytokine이 증가할 경우 면역 활성에 밀접한 관련이 있으며, Th2 세포가 분비하는 cytokine이 증가할 경우 알레르기 질환이나 아토피 질환의 유발과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되었다(30).

본 연구에서도 참모자반 추출물이 유도하는 면역 활성에 관하여 알아보기 위하여 SFP 및 SFE를 비장세포에 농도별(12.5, 25, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 비장세포가 분비하는 cytokine에 관하여 측정된 결과, SFP 처리구에서 Th1 type의 cytokine인 IL-2 및 IFN- γ 가 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났고, Th2 type의 cytokine의 증감에는 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다. 반면에 SFE 처리구의 경우 Th1 type 및 Th2 type cytokine의 분비에 어떠한 영향도 주지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 5). 따라서 이러한 결과로 미루어 보아 참모자반 추출물인 SFP의 처리는 알레르기 유발과 관련된 Th2 type cytokine의 분비에는 영향을 주지 않으며, 면역 활성에 관련이 있는 Th1 type의 cytokine의 분비량을 증가시켜 면역 활성을 유도하는 것으로 사료된다.

해양성 조류 중 갈조류에는 alginic acid, 푸코이단, laminarin 등과 같은 생리활성이 우수한 조다당 성분들이 다량

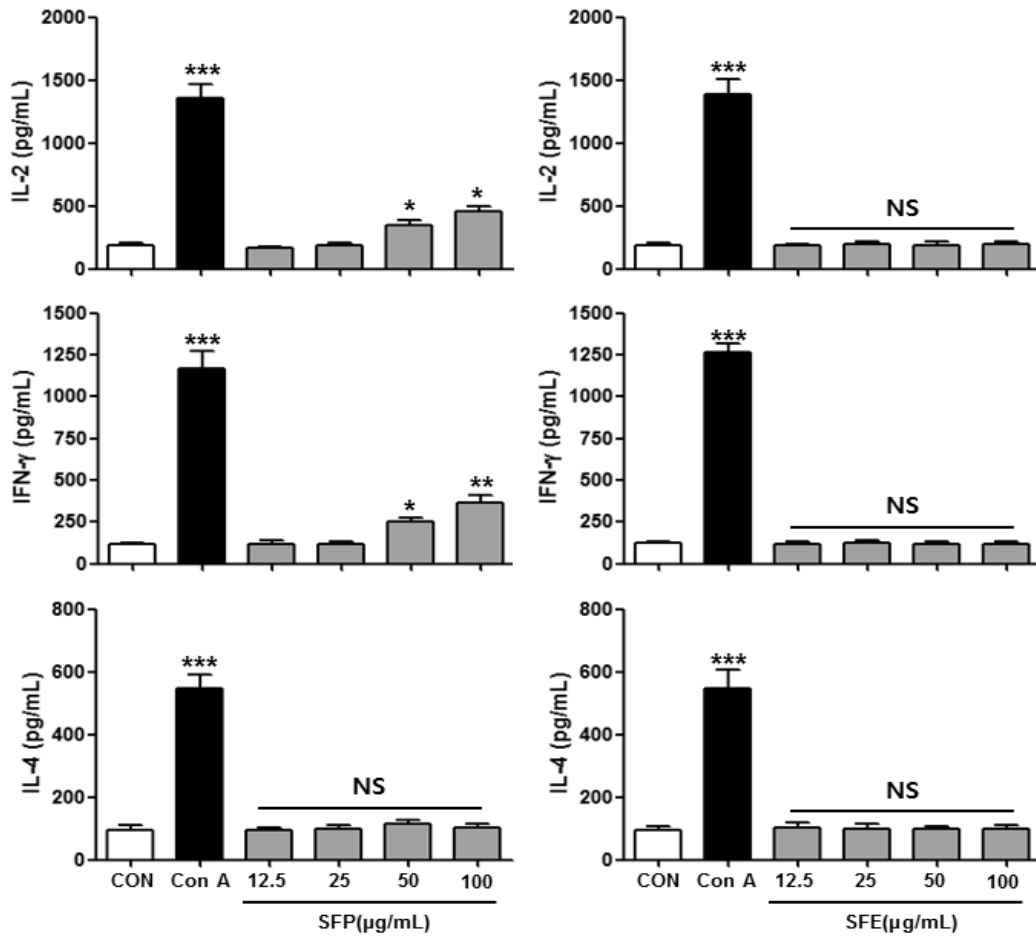


Fig. 5. Cytokine (IL-2, 4, and IFN- γ) production activity of *Sargassum fulvellum* polysaccharide (SFP) and ethanol extracts (SFE) in splenocyte separated from mouse spleen. SFP and SFE were treated at the concentration of 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ in splenocyte. Concanavalin (Con) A was also treated at the concentration of 3 $\mu\text{g/mL}$ as a specific mitogen to splenic T cells. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails t-test with a significant level of * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, compared to control (CON) group. NS denoted no significance.

함유되어 있으며, 이러한 다당류는 세포 내 골지체에서 합성되어 세포 조직에 존재하며 세포 보호를 위해 분비되는데 (31), 참모자반과 같은 갈조류에 다량 존재하는 푸코이단은 황산기를 포함하는 다당체로 세포 내 골지체에서 합성되어 갈조류의 세포 조직에 주로 존재한다. 최근 연구에 따르면 다양한 해조류(*Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida*, *Fucus vesiculosus*)로부터 정제된 푸코이단은 대식세포의 cytokine의 분비량을 증가시키고 splenic 수지상 세포의 활성을 유도시키며, 자연살해 세포의 활성을 유도하여 높은 항암활성을 나타내고 T 세포를 활성화시켜 cytokine의 분비량을 증가시킨다고 보고된다(31). 따라서 본 연구에서 참모자반 조다당 추출물인 SFP 처리구에서 대식세포 및 비장세포 등의 면역세포 활성이 높게 나타나는 것은 참모자반에 다량 함유되어 있는 푸코이단 등과 같은 생리활성 물질에 의하여 기인된 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 참모자반 조다당 추출물(SFP) 및 에탄올 추출물(SFE)의 면역 활성에 관하여 비교하기 위하여 선천면역계에서 중요한 역할을 수행하는 대표적인 세포인 대식세포와 후천면역계에서 중추적인 역할을 수행하는 비장세포에 각각 SFP와 SFE를 처리하여 각각의 면역세포의 세포 증식률과 사이토카인 분비능에 미치는 영향에 관하여 측정하여 보았다. 대식세포에 SFP 및 SFE를 각각 농도별(12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였을 때 두 추출물 모두 대식세포에 대한 세포독성을 유발하지 않았으며, 대식세포의 활성과 밀접한 관련을 가지는 NO, iNOS 및 cytokine의 분비능에 미치는 영향에 관하여 알아본 결과 SFP 처리구에서도 농도의존적으로 분비능이 증가되는 것으로 관찰되었다. 또한 마우스 비장에서 유리된 비장세포에 SFP 및 SFE를 처리하였을 때 SFP의 처리구에서 비장세포의 증식능 및 면역 활성과 밀접한 관련을 갖는 Th1 type의 cytokine인 IL-2 및 IFN-

γ의 분비능이 유의적으로 증가되는 반면, 알레르기를 유도하는 것으로 알려진 Th2 type의 cytokine인 IL-4의 함량에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 따라서 참모자반 다당류 추출물은 선천면역계와 후천면역계를 담당하는 면역세포인 대식세포 및 비장세포의 활성화에 중요한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2015년 공주대학교 학술연구의 연구비지원에 의하여 수행되었고, 또한 2014년도 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. NRF-2012R1A1A2009507)의 지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5: 971-974.
- Kim HS, Kang JS. 2008. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 109-116.
- Kim SW. 1998. Studies on anti-microbial and anti-cancer functions of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1183-1188.
- Zhu H, Zhang Y, Zhang J, Chen D. 2008. Isolation and characterization of an anti-complementary protein-bound polysaccharide from the stem barks of *Eucommia ulmoides*. *Int Immunopharmacol* 8: 1220-1230.
- Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VE, Chang ST. 1995. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from a mycelial culture of *Tricholoma* sp., a local edible mushroom. *Life Sci* 57: 269-281.
- Yadomae T. 2000. Structure and biological activities of fungal β-1,3 glucans. *Yakugaku Zasshi* 120: 413-431.
- Hikino H, Kobayashi M, Suzuki Y, Konno C. 1989. Mechanism of hypoglycemic activity of aconitan A, a glycan from *Aconitum carmichaeli* roots. *J Ethnopharmacol* 25: 295-304.
- Bae SJ. 2004. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 480-486.
- Tibbot BK, Skadsen RW. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α-glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* 30: 229-241.
- Kong CS, Um YR, Lee JI, Kim YA, Lee JS, Seo Y. 2008. Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 177-182.
- Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol* 96: 1613-1623.
- Heo SJ, Jeon YJ. 2005. Antioxidant effect and protecting effect against cell damage by enzymatic hydrolysates from marine algae. *Food Industry and Nutrition* 10(1): 31-41.
- Jeong DH, Kim KBWR, Kang BK, Jung SA, Kim HJ, Jeong HY, Park SW, Ahn DH. 2012. Anti-inflammatory activity of the water extract of *Sargassum fulvellum*. *KSBB J* 27: 325-329.
- Jeong DH, Kim KBWR, 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.
- Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. 1994. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 410-422.
- Morel F, Doussiere J, Vignais PV. 1991. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201: 523-546.
- Ramesh HP, Yamaki K, Tsushida T. 2002. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydr Polym* 50: 79-83.
- Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 89: 873-891.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615.
- Tintinalli JE, Kelen GD, Stapczynski JS. 2003. *Emergency medicine: A comprehensive study guide*. 6th ed. McGraw Hill, New York, NY, USA. p 231-242.
- Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressing effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* 569: 321-326.
- Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 2003. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: an *in vitro* cytokine study using mouse macrophage. *Clin Chim Acta* 327: 123-128.
- Ryu HS. 2008. Effects of *Job's Tears* (*Yul-Moo*) extracts on mouse splenocyte and macrophage cell activation. *Korean J Food & Nutr* 21: 1-6.
- Cha JH, Kim YS, Lee EM. 2010. Effects of *Prunellae Spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J Oriental Obstet Gynecol* 23: 91-100.
- Ryu HS, Kim J, Kim HS. 2006. Enhancing effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (sorghum, su-su) extracts on mouse spleen and macrophage cell activation. *Korean J Food & Nutr* 19: 176-182.
- Cyster JG. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286: 2098-2102.
- Zalys R, Zagon IS, Bonneau RH, Lang CM, McLaughlin PJ. 2000. *In vivo* effects of chronic treatment with [MET⁵]-enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Sci* 66: 829-834.
- Abbas AK, Lichtman AH. 2003. Cell and tissues of the immune system. In *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. WB Saunders Co., Sydney, Australia. p 264-269.
- Wang JE, Jørgensen PF, Ellingsen EA, Almiöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R. 2001. Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* 16: 178-182.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-145.
- Schaeffer DJ, Krylov VS. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicol Environ Safe* 45: 208-227.