

NF- κ B와 MAPKs 활성 저해를 통한 미야베 모자반(*Sargassum miyabei* Yendo) 에탄올 추출물의 항염증 활성

김민지¹, 배난영¹, 김꽃봉우리², 박선희¹, 장미란³, 임무혁⁴, 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³식품의약품안전처 건강기능식품정책과

⁴대구대학교 식품공학과

Received: July 4, 2016 / Revised: September 1, 2016 / Accepted: October 24, 2016

Anti-Inflammatory Activity of Ethanol Extract of *Sargassum miyabei* Yendo via Inhibition of NF- κ B and MAPK Activation

Min-Ji Kim¹, Nan-Young Bae¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Sun-Hee Park¹, Mi-Ran Jang³, Moo-Hyeog Im⁴, and Dong-Hyun Ahn^{1*}

¹Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 46041, Republic of Korea

³Health Functional Food Policy Division, Ministry of Food and Drug Safety, Chungcheongbuk-do 28519, Republic of Korea

⁴Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 38453, Republic of Korea

The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of *Sargassum miyabei* Yendo ethanol extract (SMYEE) using RAW 264.7 cells and croton oil-induced Balb/c mice. SMYEE inhibited the production of pro-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and IL-1 β] and nitric oxide in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response. In addition, SMYEE suppressed the expression of inducible nitric oxide, cyclooxygenase-2, and nuclear factor-kappa B. Further, SMYEE inhibited the expression of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), such as extra cellular signal-regulated kinase 1/2, p38, and c-Jun N-terminal kinase. In ear edema test, edema formation in the SMYEE treatment was lower than that in the positive control and was similar to that in the prednisolone treatment group. Photomicrographs of mice ear tissue showed a reduction in dermal thickness and number of infiltrated mast cells. Therefore, our results indicate that SMYEE exerts an anti-inflammatory effect via inhibition of nuclear factor (NF)- κ B and MAPK activation and can be used as a natural source of anti-inflammatory compounds.

Keywords: Anti-inflammatory activity, NF- κ B, MAPKs, *Sargassum miyabei* Yendo

서 론

염증반응은 외부의 물리적, 화학적 자극, 세균에 의한 침윤작용에 대한 면역체계반응의 하나이며 손상을 수복, 재생하려는 기전이다[41]. 그러나 만성 염증반응은 오히려 인간에게 질병을 일으키는 원인이 되기도 한다. 대식세포는 감염체에 대한 식작용을 나타내는 대표적인 백혈구로 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 물질에 의해 활성이 증가

되면 nitric oxide (NO)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β 의 cytokine을 생산하여 초기 염증반응의 중요한 역할을 한다[40]. 이들은 조직 상치나 감염 부위에 면역세포들을 유인하게 하며[5], helper T 세포, B 세포, 자연살해세포 등의 활성을 증가시키는 역할을 한다[8]. 하지만 대식세포로부터 염증 반응에 관여하는 물질들이 지나치게 분비하게 되면 과량 생성된 NO는 급성과만성염증반응을 유도하는 무기 자유라디칼 물질로서 작용하게 되고[24, 34], 염증인자들은 염증성 장질환을 일으키며 심지어 관절염, 퇴행성 뇌질환, 암과 같은 만성 질환을 유발하기도 한다[2]. 따라서 급성염증질환 또는 만성염증질환을 치료하기 위한 염증 매개 물질들을 제어하고 조절할 수 있는 부작용

*Corresponding author

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

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

이 적은 천연 항염증 물질 또는 약제 개발에 관심이 증가하고 있다.

대식세포에 있어 전염증성 cytokine 및 단백질의 유전자 발현은 nuclear factor kappa-B (NF-κB)에 의해 조절이 된다[29]. LPS와 같은 자극이 발생하게 되면 NF-κB가 활성화되게 되면서 다양한 염증성 매개체의 유전자의 발현을 유도하게 된다[6]. 또한 NF-κB의 활성화는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun-N-terminal kinase (JNK), p38 kinase를 포함하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[9, 25].

Sargassum 속은 Sargassaceae과에 속하는 갈조류로 약 400종이 알려져 있으며[27], 전세계적으로 분포하고 있어 식품이나 약재로서 많은 나라에서 이용되고 있다[15]. *Sargassum miyabei* Yendo는 주로 남해안 및 제주도에 서식하고 있으며, 생리활성에 대한 보고는 다른 Sargassum 속에 비해 많이 알려져 있지 않다. 현재, 항돌연변이[23], α-glucosidase 저해 활성[21], 항산화 활성[32]에 대해 보고되었으며, 항염증에 대한 연구는 보고된 적이 없다. 이에 본 연구에서는 *S. miyabei* Yendo를 에탄올로 추출하여 NF-κB와 MAPKs의 활성 조절을 통한 iNOS와 COX-2의 활성 억제와 NO와 전염증성 cytokine의 분비 억제 효과를 살펴보았으며, croton-oil로 유도한 귀부종 동물모델에서 귀부종 형성 및 귀조직의 변화를 관찰하여 천연 항염증 소재로서 이용가능성을 알아 보았다.

재료 및 방법

에탄올 추출물 제조

부산 백운포에서 2015년도에 채취한 미야베 모자반은 담수로 수 회 깨끗하게 세정한 후 자연건조하였다. 그 후 동결 건조하여 분말화 하였으며 진공 포장상태로 -20℃에서 저장하며 실험에 사용하였다. 10배(w/v)양의 95% ethanol을 분말에 가하여 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Korea)를 이용해 24시간 추출하였다. 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)로 1,977 × g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 분리하여 37℃에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Japan)로 농축하였다. 남은 잔사는 동일한 방법을 이용해 2회 반복하여 추출하여 에탄올 추출물을 얻었다.

세포배양

한국세포주은행(KCLB 40071, Korea)에서 murine의 대식세포주 cell line인 RAW 264.7 세포를 분양받아 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 사용하여 37℃,

5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

실험동물

귀부종 실험을 위해 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스를 오리엔트바이오(Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 마우스는 온도 20 ± 2℃, 습도 50 ± 10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일간 예비사육 하여 환경조건에 적응시켰다. 본 동물 실험은 부경대학교 동물실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 수행하였다(2015-04).

세포독성 측정

Park 등[33]의 MTT assay 방법을 약간 변형하여 시료의 세포독성을 평가하였다. RAW 264.7 세포를 1 × 10⁶ cells/ml의 농도로 96-well plate에 분주해 20시간 전 배양한 후 미야베 모자반 에탄올 추출물(SMYEE)을 농도별로(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/ml) 첨가하여 22시간 본 배양하였다. 5 mg/ml MTT (thiazol blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 첨가하고 2시간 재 배양하였다. 배양 후 4℃, 879 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 걷어내고 dimethyl sulfoxide 100 μl 분주하여 생성된 formazan을 녹여내 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation index (\% of control)} =$$

$$\text{Sample 흡광도} / \text{Control 흡광도} \times 100$$

Nitric oxide 분비량 측정

Griess 반응을 이용하여 배양액 내의 nitrite 농도를 측정하였다[22]. RAW 264.7 cell을 2.5 × 10⁵ cells/ml로 조절해 24-well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 그 후 SMYEE를 0.1, 1, 10, 50, 100 μg/ml 처리하고 1 μg/ml의 LPS로 자극하여 24시간 본 배양하였다. 배양 상층액은 4℃, 879 × g에서 10분간 원심분리하여 정량 실험에 사용하였다. Griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)과 배양 상층액은 1:1로 상온에서 10분간 반응시켜 microplate reader를 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 cell의 세포배양액 내의 TNF-α, IL-6 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, USA)를 이용해 측정하였다. RAW 264.7 cell

을 2.5×10^5 cells/ml로 조절하여 24-well plate에 접종하고 18시간 전 배양하였다. 그 후 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 별 SMYEE와 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하고 12시간의 본배양을 거쳐 원심분리를 통해 세포배양 상층액을 얻었다. ELISA는 microplate에 anti-mouse TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 capture antibody를 coating buffer에 희석 후 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이후 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척한 후 10% FBS 용액으로 blocking하였고 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 conjugate를 분주하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1 β 의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1 β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 반응 후 이를 다시 PBST로 세척하고 OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot에 의한 단백질 발현 분석

SMYEE가 세포질 내 생성되는 iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, Sheeba와 Asha [37]의 방법에 따라 cytosol lysis buffer [50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40]를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis시킨 후, 15,520 \times g에서 20 분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. NF- κ B p65의 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 lysis시킨 후 15,520 \times g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였으며 30 μl 의 lysate를 Laemmli [19]의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등 [39]의 방법을 참고하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-Rad)에 1시간 동안 전사시켜 5% skim milk가 포함된 TBSS (tris buffered saline; pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking 하였다. iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로

3회 세정하였다. 2차 항체로 HRP (horseradish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBSS로 3회 세정하여 ECL 기질과 1-3분간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool (GeneGnome5, Syngene, UK)을 이용하여 가시화하였다. MAPKs의 발현량을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/ml로 18시간 전 배양하고 SMYEE를 처리하여 30분 동안 본 배양한 후 p38, ERK, JNK 및 p-p38, p-ERK, p-JNK의 발현량을 검토하기 위하여 anti-mouse p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK 및 JNK (Cell Signaling Technology Inc., USA) 항체를 1:500으로 희석하여 사용하였다. 이후의 실험은 iNOS, COX-2 실험법과 동일하게 진행하였다.

귀부종 측정 및 조직 관찰

SMYEE의 항염증 효과를 in vivo 상에서 알아보기 위하여 Kim 등 [14]와 Saraiva 등 [36]의 방법으로 귀부종 측정 실험을 실시하였다. 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스 ($n = 5$)에 SMYEE를 10, 50 및 250 mg/kg body weight 농도로 200 μl 씩 단회 경구 투여하고 한 시간 후, 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 $\mu\text{l/ear}$ 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 에탄올 추출물을 100 mg/ml 농도로 20 μl 씩 도포하고 15분 뒤, 5% croton oil을 20 μl 씩 도포하였다. 6시간 뒤, diethylether로 마취사 시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin과 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다. 부종 생성율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

Inhibition of edema (% of control) =

Sample의 귀 두께 / Control의 귀 두께 \times 100

통계 처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (ver. 9.3, SAS Institute, Inc., USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test 법에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

RAW 264.7에 미치는 에탄올 추출물의 세포독성

SMYEE가 RAW 264.7 세포에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 농도에 따라 (0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) 추출물을

처리하고 세포 생존의 변화여부를 MTT assay를 이용해 측정하였다. 그 결과, 0.1–100 µg/ml 농도까지 PBS 처리군과 비교 시 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(Fig. 1). 이를 통해 SMYEE는 0.1–100 µg/ml에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 독성이 없는 것으로 사료되어 이 농도에서 염증 억제 활성을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 이는 큰 잎모자반 에탄올 추출물의 세포독성 실험 결과, 농도 의존적으로 세포독성이 나타나지 않은 결과와 유사하다[13].

Nitric Oxide 생성 억제 효과

NO는 인체 내 생리적이거나 병적인 반응에서 중요한 물질로서 L-arginine을 기질로 하여 NOS에 의해 L-citrulline으로 합성되는 무기 유리체로 적절한 수준에서는 혈소판억제, 면역조절, 신경전달, 혈관확장 등의 역할을 한다. 하지만 NO가 과도하게 생성되면 염증 반응을 심화시키고 shock에 의한 혈관확장, 기관지염, 다발성 경화증과 같은 병적반응 및 자가면역질환을 일으킨다[11, 18]. 본 연구에서는 SMYEE의 NO 생성 억제효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 cell에서의 NO 생성량을 griess 시약을 이용해 측정하였다. 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/ml)에서 LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 cell의 NO 생성량을 확인한 결과, LPS만으로 염증을 유발하였을 때 NO 생성량이 16.26 ± 0.15 µM이었으며 SMYEE를 100 µg/ml로 처리하였을 때 9.89 ± 0.15 µM로 44%의 NO 억제효과를 나타내었다(Fig. 2). 본 연구 결과는 큰잎모자반 추출물이 농도 의존적으로 NO 생성량의 감소를 보인 결과[13]와 참모자반 에탄올 추출물의 NO 저해능을 확인한 연구결과[10]와 유사함을 확인하였다. 따라서

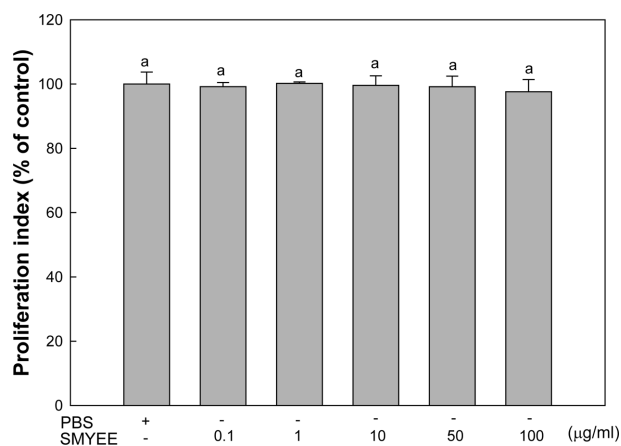


Fig. 1. Effects of *Sargassum miyabei* Yendo ethanol extract on proliferation in RAW 264.7 cells. Proliferation index (% of control) = (absorbance of sample / absorbance of control) × 100. Means with letter (a) above the bars are not significantly different ($p > 0.05$).

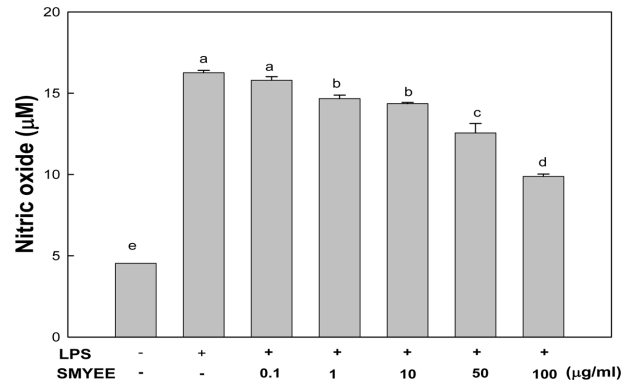


Fig. 2. Effect of *Sargassum miyabei* Yendo ethanol extract on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/ml) alone or in combination with SMYEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/ml) for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure NO levels. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

SMYEE는 LPS로 유도된 대식세포에서 증가된 NO의 생성 억제하여 염증반응 조절제로서의 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Pro-inflammatory cytokines 생성 억제 효과

LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서, SMYEE가 cytokine의 분비에 미치는 영향을 확인하기 위해 농도별로 처리하여 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 분비량 변화를 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. 그 결과(Fig. 3), LPS 의해 증가한 모든 cytokine의 분비량을 농도의존적으로 억제하는 것을 확인하였다. 먼저 IL-6의 경우(Fig. 3A), LPS에 의해 2194.93 ± 35.79 pg/ml까지 증가한 분비량을 SMYEE를 100 µg/ml로 처리했을 시 577.07 ± 15.34 pg/ml로 억제하여 74%의 뛰어난 억제효과를 나타내었다. TNF- α 의 경우, 농도 의존적으로 분비량이 억제되었으며, LPS를 단독으로 처리하여 2008.59 ± 7.73 pg/ml의 분비량을 나타낸 것과 비교하여 100 µg/ml 처리구에서는 분비량이 1289.62 ± 10.62 pg/ml로 36% 이상으로 억제되었다(Fig. 3B). LPS에 의해 증가된 IL-1 β 의 분비량은 100 µg/ml로 처리하였을 때 72% 이상의 뛰어난 억제효과를 보임을 확인하였다(Fig. 3C). 이는 참모자반 추출물을 처리한 후 pro-inflammatory cytokines의 분비량을 농도의존적으로 억제한 효과[10]과 유사하였다. LPS는 대식세포의 활성화에 관여하는 대표적인 mitogen이자 대식세포의 표면 수용체인 toll-like receptor4 (TLR4)에 결합하는 ligand로 표면 수용체 복합체의 활성화를 통해 MyD88, TIRAP/Mal, TRIF와 같은 TIR 영역을 포함하는 어댑터 단백질과 결합하여 반응하게 된다[25]. 이러한 LPS에 의해 생성되는 cytokine

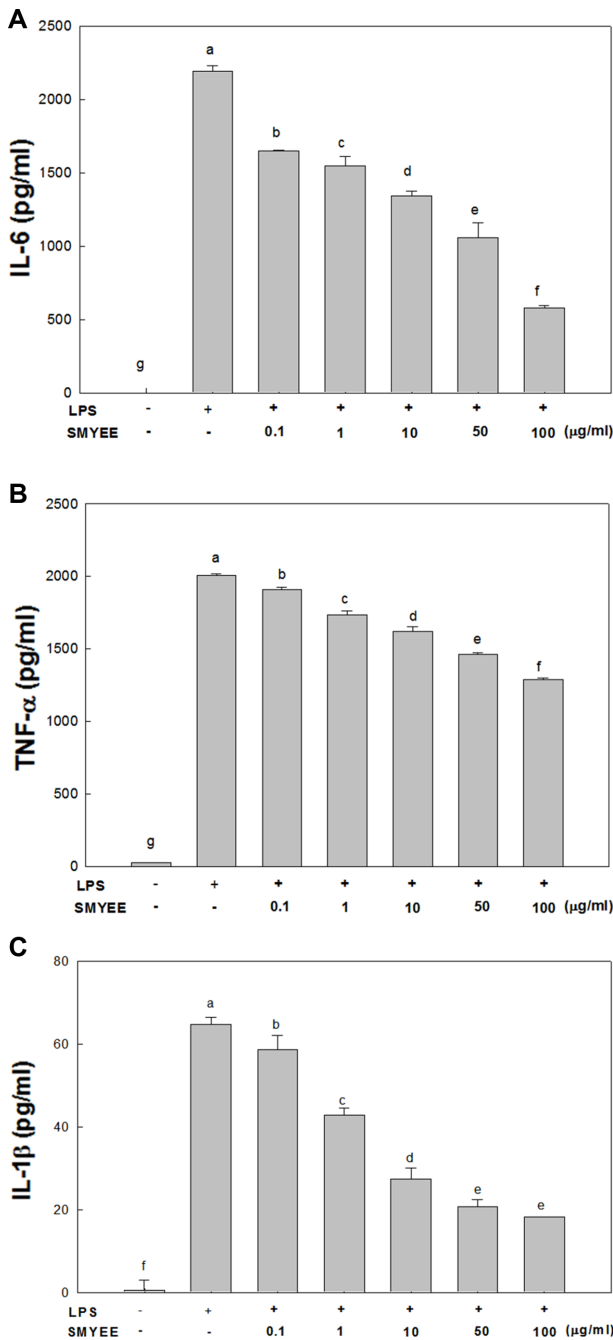


Fig. 3. Effect of *Sargassum miyabei* Yendo ethanol extract on production of IL-6 (A), TNF-α (B), and IL-1β (C) in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 μg/ml) alone or with various concentrations of SMYEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μg/ml). The levels of pro-inflammatory cytokine in the cell culture media were measured by ELISA. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

의 분비는 PGE₂와 NO의 발현을 야기하고 과도한 pro-inflammatory cytokine의 분비량 증가는 패혈증 및 심한 조

직 손상, 전신성 염증 반응 증후군을 야기한다[28]. 그 중 IL-6는 T cell, monocyte, macrophage, synovial fibroblast 등의 면역세포에서 발현되는 염증성 cytokine으로 B cell을 plasma cell로 분화시켜 항체 생산을 촉진한다[4]. TNF-α는 염증반응 과정 중 초기 주요 내인성 매개자로서 대식세포 외에도 NK cell이나 CD4 + lymphocyte에서도 생성되어 염증 부위로의 백혈구를 증가시키는 다른 염증성 cytokine과 내피 세포 부착 분자의 발현을 촉진시켜 패혈증이나 압, 염증성 장 질환 등의 자가면역 질환의 요인이 된다[41]. 또한 IL-1β는 염증반응 시 생성되는 촉진성 사이토카인으로 caspase-1에 의해 활성형으로 전환되는데 낮은 농도에서는 세포성장이나 항상성 유지에 필수적이지만 염증반응 및 면역적 자극에 의해 대량생산될 경우 T cell을 활성화 시키고 B cell을 성숙시켜 증상을 악화시킨다[20]. 따라서 본 연구 결과 SMYEE가 이러한 염증성 사이토카인을 조절하는 물질로서 염증반응으로 유도된 다양한 질병을 조절할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있다.

에탄올 추출물의 iNOS, COX-2, NF-κB 발현 억제 효과

SMYEE의 처리가 iNOS와 COX-2의 발현조절과 관련이 있는지를 조사하기 위하여 western blot 분석을 수행하였다. 그 결과(Fig. 4), LPS 처리구에서는 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 현저히 증가하였으나 SMYEE를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/ml)로 처리한 그룹에서는 농도의존적으로 감소한 경향이 보였다. 특히 iNOS의 발현량이 억제되는 현상은 SMYEE 처리가 NO 생성에 대한 억제효과를 보이는 것과 일치하였다. 전사인자인 NF-κB는 LPS에 의해 유도되는 염증성 매개물질인 iNOS와 COX-2의 발현을 촉진시킨다. 핵분획의 NF-κB p65 단백질의 발현은 LPS 처리 군에서는 대조구에 비해 유의성 있게 증가하였으나 SMYEE 처리구에서는 농도의존적인 감소 경향을 나타내었다(Fig. 4). 만성적인 염증성 질환은 NF-κB의 비정상적인 활성화와 관련이 있다. 따라서 대부분의 천연물 또는 기존의 항염증제는 핵 전사인자인 NF-κB 활성을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다고 알려져 있으며[30], NF-κB 활성을 억제시킴으로 염증성 질병과 암의 예방 및 치료에 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행 중이다[1]. 최근 연구에 따르면, Kim 등[16]과 Bae 등[3]은 각각 갈조류인 잘피 에탄올 추출물, 참도박 에탄올 추출물을 LPS로 유도된 대식세포에 처리하였을 때, NF-κB의 활성억제를 통해 iNOS 및 COX-2의 발현량이 감소함을 밝혔으며, 해조류 유래 추출물인 SMYEE를 이용한 본 연구결과와 유사함을 보였다.

에탄올 추출물의 MAPKs 발현 억제 효과

대식세포의 활성화에는 여러 가지 세포 내 신호전달계가

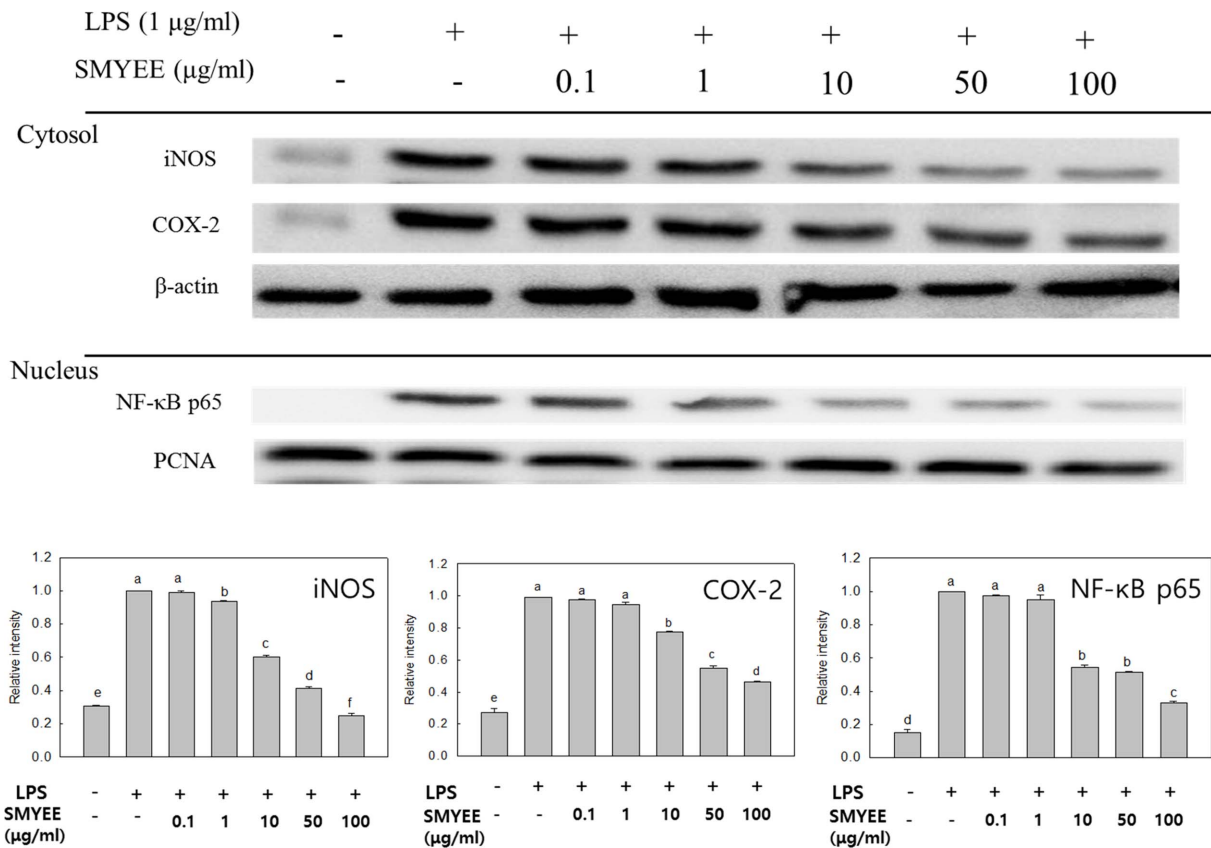


Fig. 4. Effect of *Sargassum miyabei* Yendo ethanol extract on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF- κ B p65 expression in RAW 246.7 cells. The levels of iNOS and COX-2 in cytosolic protein and NF- κ B p65 in nuclear protein were determined by a western blot analysis. RAW 246.7 cells were treated with the indicated concentrations of SMYEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 $\mu\text{g/ml}$) and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 18 h or 30 min and the proteins were detected using specific antibodies. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

관여하며 이들 신호를 제어함으로써 대식세포가 활성화 되어 발생하는 염증성 물질을 조절하는 연구가 여러 선행 연구에서 보여지고 있다[7]. 이들 중 MAPKs (ERK, JNK, p-38)의 활성화는 인산화에 의해서 나타나며 대식세포의 활성화에 관여하고 특히 NF- κ B를 활성화시켜 iNOS, COX-2 및 전염증성 매개물질의 발현에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 [9]. 따라서 SMYEE 처리에 따른 대식세포 내 인산화된 MAPKs 발현량에 미치는 영향을 western blot으로 분석한 결과(Fig. 5), LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs에 속한 단백질이 모두 활성화 되었음을 알 수 있었다. 반면, SMYEE를 처리한 결과, 인산화된 ERK, JNK, p-38의 발현이 LPS 처리군에 비해 농도의존적인 감소를 보였으며, 특히 인산화된 p-38 및 JNK의 발현량이 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 LPS를 처리하지 않은 대조군과 비슷한 수준까지 발현량이 감소함을 보였다. 본 연구 결과는 잘피 에탄올 추출물의 항염증 활성 효과[16] 및 꽃지누아리 에탄올 추출물의 항염증

활성 효과[17]에서 추출물 농도 의존적으로 MAPKs의 인산화 농도가 감소함을 보인 것과 유사하다. 이상의 결과를 종합해볼 때 SMYEE를 처리함으로써 LPS로 유도된 염증성 사이토카인, iNOS 및 COX-2와 같은 염증성 인자들의 활성화에 관련하여 MAPKs 신호전달 경로를 효과적으로 억제함에 따라 항염증 작용을 보인 것으로 사료된다.

귀부종 억제 효과 및 조직 관찰

염증은 인체의 물리적, 화학적 손상에 대한 보호작용으로 발열이나 부종, 통증 등을 동반하며 세포질 내 과립을 다량 가진 비만세포는 활성화되어 protease나 histamine 등과 같은 혈관확장 물질들을 분비한다. 혈류량 증가로 인해 혈액 내의 neutrophils 등이 혈관 밖의 조직으로 부과되어 부종을 유발하며 염증 부위의 prostaglandin 증가를 통해 통증이 발생한다[12]. SMYEE가 미치는 부종의 완화효과 및 조직 내의 mast cell 침윤 억제효과를 확인하기 위해 10, 50 및

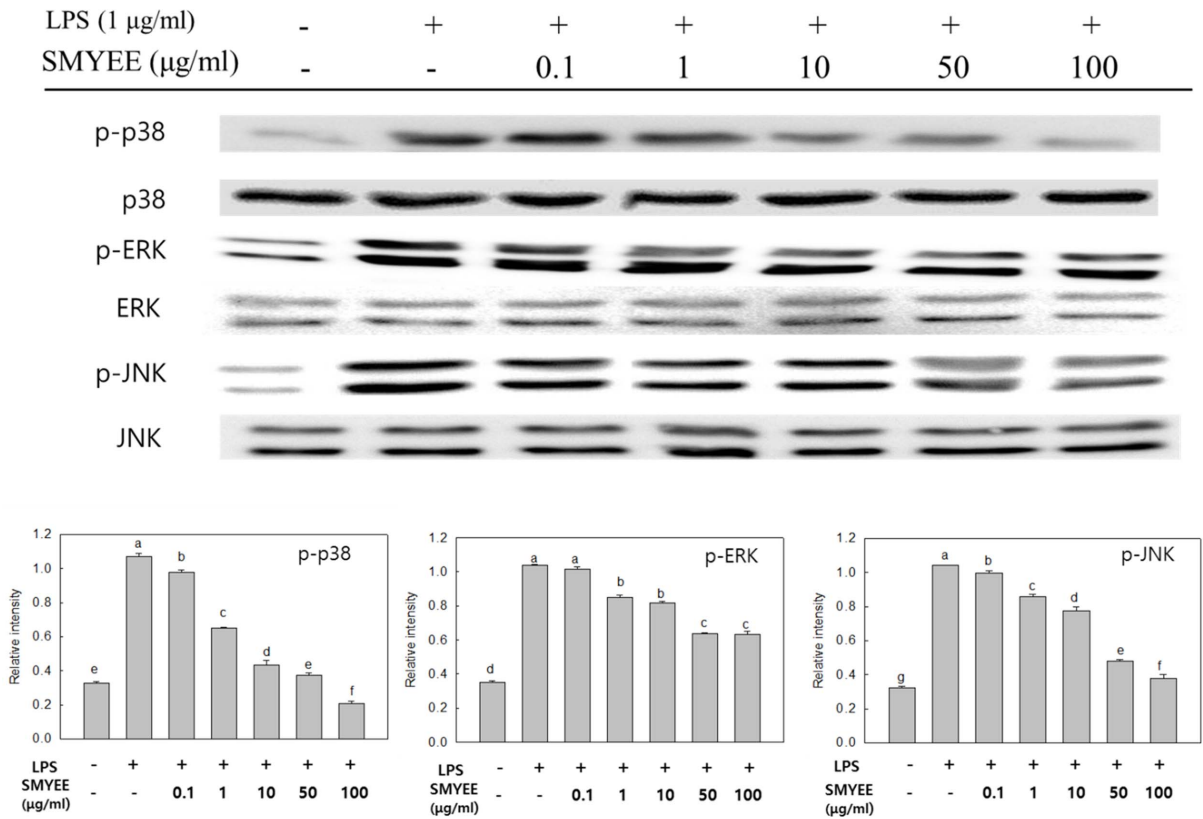


Fig. 5. Effect of *Sargassum miyabei* Yendo ethanol extract on MAPKs expression in RAW 246.7 cells. The levels of p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK, and JNK in the cytosolic protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of SMYEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 30 min, and the proteins were detected using specific antibodies. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

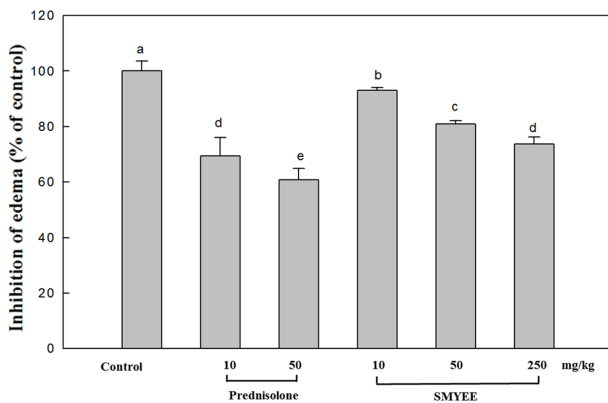


Fig. 6. Inhibition of *Sargassum miyabei* Yendo ethanol extract against croton oil-induced mouse ear edema. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

250 mg/kg 농도로 경구 투여한 후 croton oil로 염증을 유발하고 귀 두께를 측정하였다. 마우스 모델에서 부종실험을 진행한 결과(Fig. 6), croton oil 만을 처리하여 부종이 발생한

대조군과 비교 시 SMYEE 처리에 의해 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소하였다. Croton oil은 피부에 도포하면 즉각적으로 강한 급성 염증반응을 유도하는데[38] croton oil로 유발한 부종을 추출물 250 mg/kg 농도에서 positive control인 prednisolone이 10 mg/kg 농도로 처리하였을 때와 유사하게 약 27% 이상 억제하는 효과를 확인하였다. 이는 조직관찰에서 추출물을 100 mg/ml 농도를 처리하였을 시, 진피의 두께가 현저히 얇아진 것을 확인하였으며(Fig. 7A), 조직내 mast cell 관찰 결과에서도 SMYEE를 처리함으로써 mast cell의 침윤을 positive control과 유사한 수준으로 억제하였다(Fig. 7B). 염증과 통증의 완화를 위해 사용되는 비스테로이드계 소염진통제는 여러 부작용이 보고[35]된 바 있어 현재 천연물로부터 항염증 및 진통제로서의 가능성을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는데 앞의 연구결과로 미루어 볼 때, SMYEE는 기존의 항염증제와 유사한 정도의 부종억제효과를 나타냄에 따라 뛰어난 항염증 효과를 가져 이를 이용한 치료제 개발에도 가능성이 있을 것으로 사료된다.

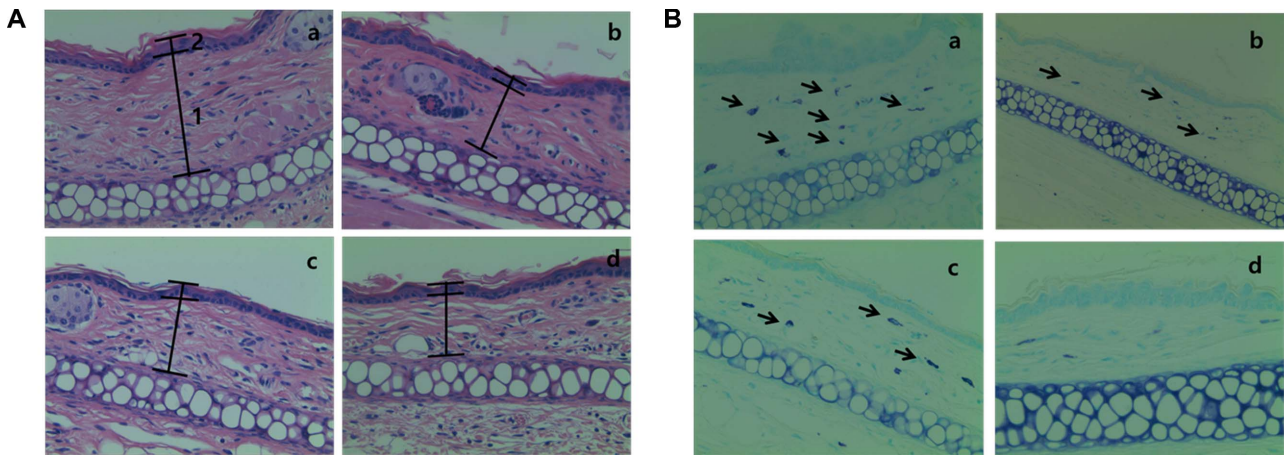


Fig. 7. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of 5% croton oil (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) examined under light microscopy (magnification: 200 \times). Treatments: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

요약

본 연구에서는 미야베 에탄올 추출물의 항염증 활성을 확인하기 위해 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포와 croton-oil로 유도된 귀부종 동물 모델을 이용하였다. 그 결과, SMYEE 50 및 100 μ g/ml 농도처리 시, LPS로 유도된 염증반응에서 NF- κ B 활성 억제와 더불어 MAPKs의 인산화를 효과적으로 억제함을 보였다. LPS에 의해 증가된 NO와 전염증성 사이토카인의 분비량도 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 SMYEE는 croton oil로 부종을 유발한 마우스모델에서 귀부종 억제 효과를 나타내었고, 조직의 진피 두께 및 mast cell의 수가 현저히 감소하였음을 확인하였다. 이를 통해 SMYEE는 염증 반응의 전사인자인 NF- κ B 및 MAPKs의 활성을 조절함으로써 iNOS와 COX-2의 발현 및 전염증성 매개인자인 NO, IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 분비를 억제하여 항염증 활성을 가지는 것을 확인하였다. 현재까지 미야베 모자반내의 항염증 효능 물질에 관한 연구는 보고되지 않고 있으며 향후 실험을 통해 미야베 모자반 에탄올 추출물로부터 항염증 효과를 가지는 유효성분을 밝히기 위한 분리 연구를 진행할 예정이다.

Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2012R1A6A1028677).

References

- Aggarwal BB. 2004. Nuclear factor- κ B: The enemy within. *Cancer Cell* **6**: 203-208.
- Atreya R, Neurath MF. 2005. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **28**: 187-196.
- Bae NY, Kim MJ, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Park JH, et al. 2015. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Grateloupia elliptica* Holmes on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells and mice ears. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 1128-1136.
- Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. 2002. Mitogen-activated protein kinases and NF- κ B regulate H. pylori-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem. J.* **368**: 121-129.
- Bosca LM, Zeini M, Traves PG, Hortelano S. 2005. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: A role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology* **208**: 249-258.
- Chen XL, Kunsch C. 2004. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr. Pharm. Des.* **10**: 879-891.
- Guha M, Mackman M. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**: 85-94.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin L, Rachlin EM. 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 87-94.
- Jang BC, Paik JH, Kim SP, Shin DH, Song DK, Park JG, et al. 2005. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF- κ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cell. Signal.* **17**: 625-633.
- Jeong DH, Kim KBWR, Kim MJ, Kang BK, Bark SW, Pak WM, et al. 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.
11. Jeong HR, Sung MS, Kim YH, Ham HM, Choi YM, Lee JS. 2012. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 888-894.
 12. Ju MS, Jeong HU, Kim HG, Park GH, Youn YS, Kim YO, et al. 2010. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Geranii herba*. *Korea J. Herbol.* **25**: 97-101.
 13. Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Ahn NK, et al. 2015. Anti-inflammatory effect of *Sargassum coreanum* ethanolic extract through suppression of NF- κ B pathway in LPS induced RAW 264.7 cells in mice. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 112-119.
 14. Kim DW, Chi YS, Son KH, Chang HW, Kim JS, Kang SS, et al. 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.
 15. Kim KN, Kim J, Yoon WJ, Yang HM, Heo SY, Ko JY, et al. 2013. Inhibitory effect of *Sargassum patens* on inflammation and melanogenesis. *Int. J. Pharmacol.* **9**: 524-532.
 16. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Cho YJ, et al. 2015. Anti-inflammatory effect of *Zostera marina* ethanolic extract on LPS-induced RAW 264.7 cells and mouse model. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **30**: 182-190.
 17. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Choi JS, et al. 2016. Anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract on LPS-induced RAW 264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **45**: 181-187.
 18. 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.
 19. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 20. Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. 2000. Induction of an angiogenic phenotype in endometrial stromal cell cultures by interleukin-1 β . *Mol. Hum. Reprod.* **6**: 269-275.
 21. Lee EH, Han J, Ahn HR, Kim MC, Kim CY, Pan CH, et al. 2009. Inhibitory effects of the compounds isolated from *Sargassum yezeense* on α -glucosidase and oxidative stress. *Korean J. Pharmacogn.* **40**: 150-154.
 22. 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.
 23. Lei C, Hui T, Ting F, Jianbo X. 2016. Agrimonolide from *Agrimonia pilosa* suppresses inflammatory responses through down-regulation of COX-2/iNOS and inactivation of NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Phytomedicine* **23**: 846-855.
 24. Libby P. 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**: 456S-460S.
 25. Majdalawieh A, Ro HS. 2010. Regulation of I κ B α function and NF- κ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflamm.* **2010**: 1-27.
 26. Marks-Konczalik J, Chu SC, Moss J. 1998. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J. Biol. Chem.* **273**: 22201-22208.
 27. Mattio L, Payri CE. 2011. 190 years of Sargassum taxonomy, facing the advent of DNA phylogenies. *Bot. Rev.* **77**: 31-70.
 28. Nathan C, Xie QW. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**: 915-918.
 29. Pahan K, Sheikh FG, Liu X, Hilger S, McKinney M, Petro TM. 2001. Induction of nitric-oxide synthase and activation of NF- κ B by interleukin-12 p40 in microglial cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 7899-7905.
 30. Pande V, Ramos MJ. 2005. NF- κ B in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **12**, 357-374.
 31. Park YB, Kim IS, Yoo SJ, Ahn JK, Lee TG, Park DC, et al. 1998. Elucidation of anti-tumor initiator and promoter derived from seaweed-2: investigation of seaweed extracts suppressing mutagenic activity of PhIP and MeIQx. *J. Korean Fish. Soc.* **31**: 581-586.
 32. Park YB. 2005. Determination of nitrite-scavenging activity of seaweed. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 1293-1296.
 33. 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 nuclear factor- κ B in RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 985-990.
 34. Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA. 2002. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 177-200.
 35. Sánchez-Borges M. 2010. NSAID hypersensitivity (respiratory, cutaneous, and generalized anaphylactic symptoms). *Med. Clin. North Am.* **94**: 853-864.
 36. Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, Menezes KD, Leite GO, Kerntopf MR, et al. 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.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Towbin HT, 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.

40. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**: 1779-1784.
41. Xin C, Jingshan M, Hao W, Fang Z, Jie H, Peng G, *et al.* 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.
42. Zamora R, Vodovtz Y, Billiar TR. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* **6**: 347-373.