

LPS로 유발한 대식세포의 염증반응과 마우스 귀 부종에 대한 구멍갈파래 에탄올 추출물의 항염증 효과

김민지¹, 김민주¹, 김꽃봉우리¹, 박선희¹, 최현덕², 박소영¹, 장미란³, 임무혁⁴, 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³식품의약품안전처 건강기능식품정책과

⁴대구대학교 식품공학과

Received: September 19, 2016 / Revised: November 16, 2016 / Accepted: November 24, 2016

Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from *Ulva pertusa* Kjellman on LPS-induced RAW 264.7 Cells and Mouse Model

Min-Ji Kim¹, Min-Ju Kim¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim¹, Sun-Hee Park¹, Hyeun-Deok Choi², So-Yeong 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

Recently, various marine algae have been considered as a natural resource for anti-inflammation. In this research, we investigated the anti-inflammatory activity of *Ulva pertusa* Kjellman ethanol extract (UPKEE). This study showed that UPKEE inhibited the secretion of cytokines including IL-6, TNF- α , and IL-1 β , and reduced the expression of NF- κ B and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) as well as iNOS and COX-2. In the formation of mouse ear edema test, three doses (10, 50, 250 mg/kg body weight) of UPKEE showed inhibitory activity after inducing inflammation using croton oil. In conclusion, we found that UPKEE showed an inhibitory effect on NF- κ B and MAPKs, and reduced the secretion of inflammatory cytokines. This result suggests that UPKEE can be used as a natural anti-inflammatory resource in food industry.

Keywords: *Ulva pertusa* Kjellman, anti-inflammation, NF- κ B, MAPKs

서 론

일상생활에서 일어나는 면역반응은 인체 내부에서 발생하는 생리적 보호 활동이며 염증은 우리의 눈으로 흔히 확인할 수 있는 면역 반응 중 하나이다. 외부로부터의 세균에 감염되거나 물리적, 화학적 자극을 받게 되면 우리 몸에서는 그 자극을 인지하고 방어기작을 나타내어 외부의 자극을 완화시키거나 균을 제거하고 손상된 조직을 회복할 수 있도록

한다. 하지만 그 반응이 과다하게 되면 염증의 형태로 발생하게 되며 염증은 특히 대식세포(macrophage)가 가장 큰 관여를 한다[15]. 대식세포에는 다양한 receptor가 존재하며 여러 가지 숙주 반응과 관련하여 항상성을 유지시킨다. 균이 침입함과 동시에 혈관의 투과성이 증대되면서 혈관 내로 염증과 관련된 물질이 분비되어 통증을 유발하고, 붉어지며 붓고 열을 발생시키기도 한다[14]. 대식세포는 여러 가지 cytokine들을 분비하여 직접적으로 외부의 물질을 파괴하거나 다른 면역세포들을 모아 염증반응을 매개한다. 염증에 관여하는 cytokine은 다양하게 존재하나 그 중에서도 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6)가 대표적이며 대식세포의 toll like receptor 4

*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

(TLR4)로부터 인식되어 신호전달의 반응으로 인하여 전사 인자들의 활성화가 일어나게 된다. 대표적인 연쇄반응에는 nuclear factor- κ B (NF- κ B)와 mitogen-activated protein kinase (MAPKs)가 있다. 외부의 자극이나 침입한 균을 제거하기 위해 분비된 염증 매개 cytokine이 과다하게 분비되면 여러 가지 염증 질환에 기여하게 되는 것이다[5]. 핵으로 전사된 NF- κ B는 cytokine 이외에도 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 유전자를 발현시킨다. 염증반응이 시작되면 cytokine은 과량 분비가 일어나 염증 관련 질환을 일으키며, 염증성 cytokine 등에 의하여 발현된 iNOS는 nitric oxide (NO)의 생성을 촉진시킨다[23]. NO는 우리 몸에서 병리학적으로 중요한 역할을 수행하며 박테리아를 죽여 면역반응에 관여하지만 이 분비량이 과도하게 증가할 경우에는 숙주에 심화된 염증 반응을 일으켜 부정적인 결과를 초래한다고 알려져 있다[18]. COX는 일반적으로 COX-1과 COX-2 두 가지의 이성질체로 존재하는 단백질이다. 특히 염증에서는 COX-2가 PGE₂를 생성시켜 염증반응을 일으키는데 COX-2의 발현은 세포가 손상되거나 고통, 부종 및 발열, 신생혈관 형성 및 전이 같은 종양 생성과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다[4]. MAPKs의 활성화는 대식세포에서 일어나며 extra cellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun NH₂-terminal kinase (JNK), p-38과 같은 주요 3개의 인자가 존재한다. 이러한 signaling pathway의 활성을 억제함으로써 염증성 cytokine의 분비량을 억제하고자 하며 유효물질을 천연물로부터 확인하고자 현재 많은 관련 연구들이 진행되고 있다[10]. 본 연구에서 사용된 구멍갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)는 녹조류의 하나로 단독 혹은 2-3가닥으로 뭉쳐서 자라며 10-30 cm 또는 그 이상에 달한다. 담수가 유입되는 지역에 많이 자라며 다량의 미네랄을 농축하고 있고, 식이섬유에 의한 정장작용[1, 22] 등과 같은 그 효능이 입증된 바 있다. 구멍갈파래는 특히 황산기를 함유한 다당을 다량 함유하고 있어 이로 인한 항 종양성[23], 항 바이러스성[2], 면역 증진의 효과[20], 혈액의 항 응고작용[17] 등의 효과가 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 구멍갈파래 에탄올 추출물을 이용하여 항염증 활성을 확인하고 식품, 의약품 분야에서의 천연소재로서 활용가능성을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용한 구멍갈파래는 2015년도 연화리에서 채집해온 것으로 자연건조 이후 동결건조를 2일 이상 실시하였다. 동결건조가 완료된 구멍갈파래 시료는 분말화한 후 진공 포장하여 -20°C에서 보관하였다. 분말을 이용하여 예

탄을 추출 24시간씩 3회 실시하고 농축하여 이를 본 실험의 재료로 사용하였다.

실험동물

수컷의 생후 8주령 ICR 마우스를 귀 부종 및 귀 조직 실험에 사용하였다. 마우스는 오리엔트바이오(Orient Co., Korea)로부터 구입을 하였다. 실험에 사용한 마우스는 온도 20 ± 2°C, 습도 50 ± 10%, 12시간의 명암주기가 유지되는 동물실에서 1주일간 안정기를 가진 이후에 실험을 진행할 수 있도록 하였다. 본 동물 실험은 부경대학교 동물실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 수행하였다(2015-04).

세포배양

한국세포주은행(KCLB 40071)에서 분양받은 대식세포 RAW 264.7을 사용하여 세포배양을 실시하였다. RAW 264.7 cell은 DMEM 배지 10%에 inactivated fetal bovine serum 과 1% penicillin-streptomycin 10%를 첨가한 배지를 배양액으로 하여 배양을 실시하였으며 배양 조건은 37°C, 5% CO₂를 유지할 수 있도록 하였다. 실험을 진행하는 과정 중에 사용된 모든 세포들은 전체 plate의 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양을 하였고 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

세포 독성 측정

본 실험에서 사용한 구멍갈파래 에탄올 추출물의 세포 독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 1 × 10⁶ cells/ml의 RAW 264.7 cell을 plate에 분주하고 20시간 전 배양을 실시하였다. 이후에 1 μg/ml의 LPS와 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/ml)로 구멍갈파래 에탄올 추출물을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator (MCO-15AC, Sanyo, Japan)에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양을 완료한 후 5 mg/ml 농도의 MTT 시약을 분주하여 2시간 재 배양하였다. 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Korea)하여 상층액을 걷어낸 이후, 각각의 well에 DMSO를 첨가하여 microplate reader (Model 550, Bio-rad, USA)의 540 nm에서 흡광도(optical density (O.D))를 측정을 하였다. 세포 독성은 다음과 같은 식에 의거하여 계산하였다.

$$\text{Cell Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{sample 흡광도}}{\text{control 흡광도}} \times 100$$

Nitric Oxides(NO) 생성량 측정

NO 생성량을 측정하기 위하여 본 실험은 Kim 등[14]의 방법에 따라서 Raw cell 264.7 cell을 DMEM 배지를 이용하여

2.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Japan)에서 20시간 전 배양을 실시하였다. 이후, 세포에 1 µg/ml의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/ml의 구멍갈파래 에탄올 추출물을 처리하였으며 다시 24시간 배양을 실시하였다. 배양이 완료된 후 배양액의 상층액을 얻었고 동량의 griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader (Model 550, Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess 반응[16]을 이용하여 측정하였고 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

염증관련 cytokines 분비량 측정

염증과 관련된 세포배양액 내의 TNF-α, IL-6 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, USA)를 이용하여 측정을 실시하였다. ELISA법은 Kim 등[11]의 방법에 따라 분비량을 측정하기 전 하룻밤 정도 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF-α, IL-6 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 coating하였다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 실시하고 PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 NO를 측정하였던 것과 동일한 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse TNF-α, IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 여기서 IL-1β의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1β detection antibody를 첨가하여 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후, microplate reader (Model 550, Bio-rad, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS, COX-2, NF-κB 측정

RAW 264.7세포를 배양하여 구멍갈파래 에탄올 추출물이 세포질 내에 생성되는 iNOS, COX-2 및 NF-κB의 발현량에 미치는 영향을 알아보았다. RAW 264.7 세포의 배양이 끝난 세포를 획득하여 PBS (phosphate buffered saline)로 3회 세척을 반복한 후, cytosol extraction lysis buffer [50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 µg/ml aprotinin, 1% Triton X-100, and 0.1% NP-40] 및

nuclear extraction lysis buffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT)를 각각 사용하여 30분간 4°C에서 lysis를 실시하였다. 이후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 사용하여 정량하였으며, 30 µl의 lysate를 10% SDS-PAGE로 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-rad, USA)에 70 mA에서 1시간 30분 동안 전사시킨 후, 5% skim milk가 포함된 TBSS (tris buffered saline; pH7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF-κB를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정한 것을 이용하여 iNOS, COX-2 및 NF-κB의 발현 양을 검토했기 위한 항체로 이용하였다. 2차 항체로 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBSS로 3회 세정하여 ECL 기질과 1-3분 간 반응한 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool (Syngene software)를 이용하여 가시화 하였다.

MAP kinase (JNK, ERK, p38) 발현량 측정

MAPKs의 발현량을 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/ml로 18시간 배양을 실시하고 구멍갈파래 에탄올 추출물을 처리하여 30분 동안 본 배양을 실시하였다. 배양이후 iNOS, COX-2와 동일한 방법으로 실험이 진행되었다. 인산화된 c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signalregulated kinase (ERK), p38 protein kinase (p38)의 발현량을 측정하기 위하여 anti-mouse JNK, ERK 및 p38 (Cell Signalling Technology Inc., USA) 항체를 1:500으로 희석하여 사용하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

귀 부종 및 조직에 관한 실험을 하기 위해 사용된 생후 8주령의 수컷 ICR 마우스에 Kim [10] 등의 방법에 따라 10, 50, 250 mg/kg·body weight의 농도별 구멍갈파래 에탄올 추출물을 200 µl씩 경구 투여하였다. 1시간 후, 2.5% croton oil을 20 µl/ear 농도로 도포하여 귀 부종을 유발시켰다. 마우스의 오른쪽 귀에 croton oil을 처리한 이후 5시간 지난 뒤에 귀 두께를 측정하였으며 croton oil을 처리한 이후에 두께의 증가를 부종의 형성으로 보기로 하였다. 귀 조직에 침윤된 mast cell과 귀 조직 두께 변화를 측정하기 위하여 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 구멍갈파래 에탄올 추출물을 100 mg/ml 농도로 20 µl씩 도포하고 15분 뒤, 5% croton oil을 20 µl씩 도포하였다. 그로부터 6시간 이후에 diethylether로 마취 사 시켜 귀 조직을 절제하였으며 이는 10% formaldehyde로

72시간 고정할 수 있도록 하였다. 고정하고 난 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

위의 실험에 대한 결과의 유의차 검정은 SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, USA)에서 평균값을 분산 분석하고 Duncan's multiple range test 법에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하도록 하였다.

결과 및 고찰

세포 독성 측정

구멍갈파래 에탄올 추출물이 대식세포에 미치는 독성을 평가하기 위하여 세포 내 미토콘드리아의 활성을 측정하는 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell에 추출물을 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/ml의 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 세포의 생존율을 확인해본 결과, 모든 처리 농도에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며 이를 통하여 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 1).

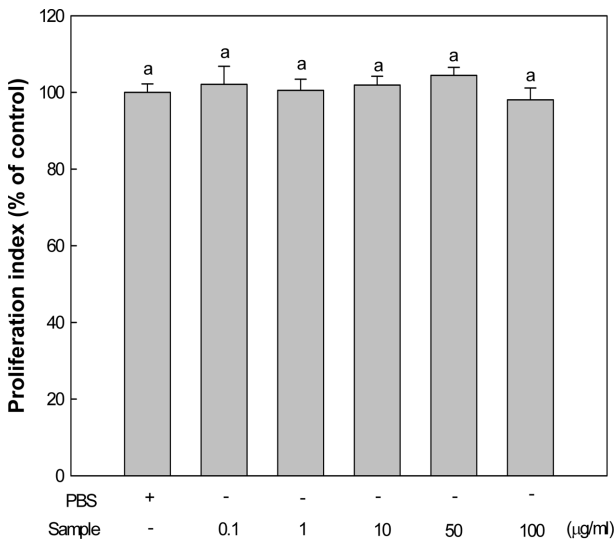


Fig. 1. Effect of *Ulva pertusa* Kjellman ethanol extract (UPKEE) on the cell cytotoxicity of RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of UPKEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/ml) for 24 h. Cell cytotoxicity was determined by MTT assay. Cell cytotoxicity (% of control) = (sample O.D. / control O.D.) × 100. Means with letter (a) above the bars are not significantly different ($p > 0.05$).

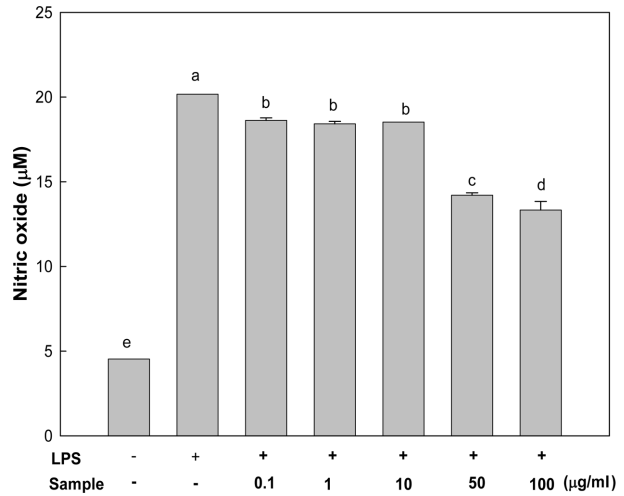


Fig. 2. Inhibitory effect of *Ulva pertusa* Kjellman ethanol extract (UPKEE) on the production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/ml) alone or in combination with UPKEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/ml) for 24 h. The culture media of the treated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

Nitric oxide (NO) 생성 억제 효과

NO는 인체 내에서 방어기능을 수행하며 이외에도 신호 전달 기능, 신경 독성, 혈관 확장 등의 여러 가지 생리적 기능을 가지고 있다. 외부의 자극이나 균의 침입이 발생되면 이를 제거하고 인체를 보호하기 위한 NO의 분비량은 증가하게 되나, 분비량의 정도가 정상 범위 이상으로 나타나게 되면 조직의 손상이나 염증질환을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다[19]. 이에 따라 구멍갈파래 에탄올 추출물이 NO 생성 정도에 미치는 영향을 측정하기 위하여 RAW 264.7 cell을 LPS로 활성화 시킨 후에 구멍갈파래 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/ml)로 처리하여 NO 생성량 측정을 실시하였다. 그 결과, 구멍갈파래 에탄올 추출물을 처리한 경우 NO의 생성량은 LPS를 처리했을 때와 비교하여 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 특히, 50 µg/ml의 농도 이후부터는 LPS 단독처리군과 비교 시 34% 이상의 NO의 생성량 감소를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Kang 등[9]의 연구에서 사용된 갈조류인 다시마 뿌리 에탄올 추출물을 같은 실험조건에서 실시했을 때 100 µg/ml의 농도에서 28%의 NO 생성 억제효과를 보인 결과보다 더 높은 저해활성을 보였다.

염증 관련 cytokines 생성 억제 효과

RAW 264.7 세포는 그람 음성균의 세포 외막에 존재하는 내독소 LPS의 자극에 의하여 여러 가지 염증 매개인자의 분

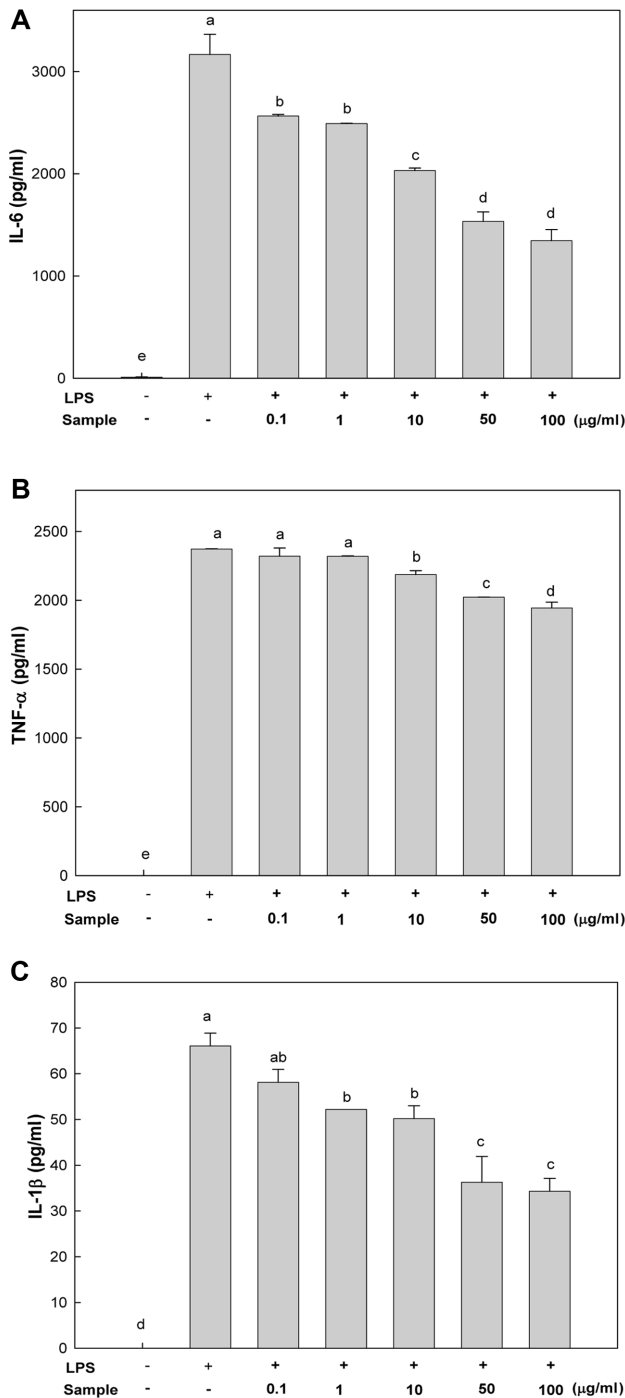


Fig. 3. Inhibitory effect of *Ulva pertusa* Kjellman ethanol extract (UPKEE) on the production of IL-6 (A), TNF- α (B), and IL-1 β (C) in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 μ g/ml) alone or with various concentrations of UPKEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μ g/ml).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

비를 촉진한다[12]. 대표적 염증성 cytokine인 TNF- α 는 바이러스 감염에 대한 저항의 기능을 가진 중요한 염증 관련 cytokine이며 이는 IL-1 β 와 IL-6의 발현을 조절하는 것으로 밝혀져 있다[8]. IL-1 β 는 국소 염증 반응을 매개하며 T 세포의 활성화와 B 세포의 성숙을 돕는다. 염증 반응 시 시상하부에 작용하여 발열증상을 일으키는 것으로 알려져 있다[9]. 또한, IL-6는 T 세포를 활성화 하고 염증매개물질을 발현시켜 후천성 면역을 개시하는 물질로 알려져 있다[11]. 염증성 cytokine의 생성량에 대한 구멍갈파래 에탄올 추출물의 효과를 알아보기 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS 처리한 이후, 구멍갈파래 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 농도가 모두 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). IL-6와 TNF- α 는 LPS만 처리한 경우와 비교하였을 때, 0.1 μ g/ml의 처리구부터 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. IL-1 β 는 모든 농도에서 LPS 단독 처리구에 비하여 감소함을 보였으며 특히 100 μ g/ml의 농도에서는 LPS 단독처리구의 발현량에 비하여 약 51% 정도의 확연한 감소량을 확인할 수 있었다. 이 결과는 꽃지누아리 에탄올 추출물을 같은 농도별로 처리했을 때 나타나는 결과와 유사하며[11], 이를 통하여 구멍갈파래 에탄올 추출물이 RAW 264.7 Cell에서 염증과 관련된 cytokine을 효과적으로 억제한다고 사료된다.

iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현 억제 효과

외부의 물질이 침입하여 대식세포가 작용하게 되면 NF- κ B는 인산화 됨으로써 활성화되어 핵 내로 이동된다. 핵 내에서 유전자 발현이 일어나면 iNOS, COX-2를 합성한다[15]. NO의 합성효소인 iNOS는 외부자극으로부터 유도되며 장시간 동안 다량의 NO를 분비하며 NO는 조직의 손상, 부종과 같은 염증질환을 촉진하며 다른 염증매개 물질의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시킨다[9, 11]. NF- κ B는 다양한 cytokine의 합성을 조절하는 전사인자로, 염증의 반응에서 iNOS, COX-2, NF- κ B의 생성 및 활성 억제를 확인함으로써 항염증의 효과를 기대할 수 있다. 따라서, RAW 264.7 cell에 구멍갈파래 에탄올 추출물을 0.1 μ g/ml의 농도부터 100 μ g/ml 농도로 처리하고 각 단백질의 발현량을 western blot을 이용하여 측정하였다. 그 결과(Fig. 4), LPS 단독 처리구에서 모든 단백질의 발현량이 현저하게 증가하였으나 iNOS 및 COX-2의 발현량은 농도 의존적으로 감소하였으며 최종농도인 100 μ g/ml 농도 처리구에서 LPS 단독처리와 비교 시 각각 36% 및 40%의 발현량이 감소됨을 확인하였다. 또한, 염증 관련 전사인자인 NF- κ B의 발현량은 추출물 0.1 μ g/ml의 처리 농도부터 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 잘피 에탄올 추출물을 처리했을 경우와 유사한

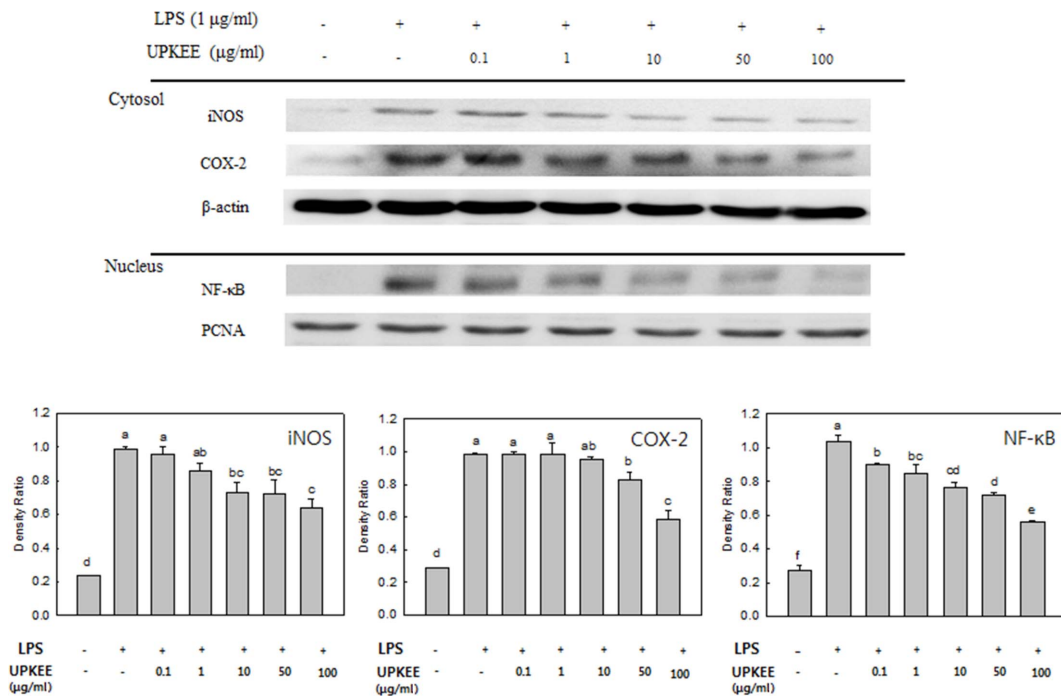


Fig. 4. Effect of *Ulva pertusa* Kjellman ethanol extract (UPKEE) on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF-κB p65 expression in LPS-induced RAW 246.7 cells. The levels of iNOS, COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF-κB in nuclear protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of UPKEE (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 PCNA signal. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

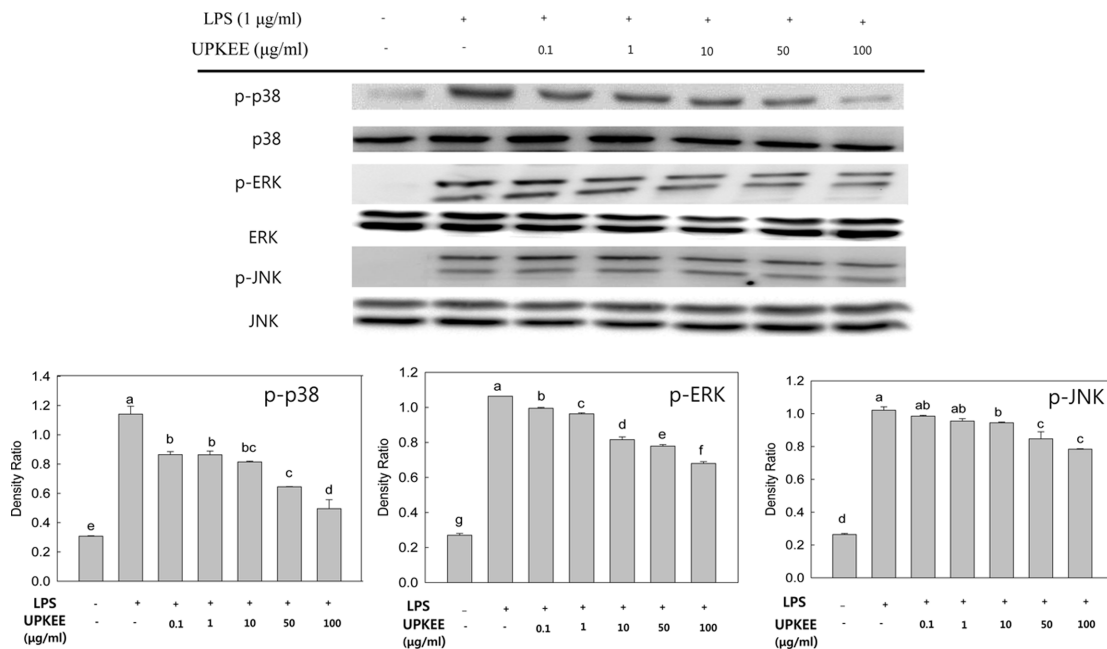


Fig. 5. Effect of *Ulva pertusa* Kjellman ethanol extract (UPKEE) on MAPKs expression in LPS-induced RAW 246.7 cells. The levels of p-p38, p-ERK, and p-JNK in the cytosolic protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of UPKEE (0.1, 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 ($p < 0.05$).

결과를 보였으며[10], 이 외에도 참도박 에탄올 추출물이 iNOS와 COX-2를 저해하는 항염증 효과[3]에서 유사한 결과를 나타내었다. 이상의 결과를 바탕으로 구멍갈파래 에탄올 추출물 처리 농도에 따른 효과적인 NF- κ B의 발현량 억제에 의해 염증성 cytokine 생성량이 감소한 것으로 사료된다. 또한 NO의 생성량과 관련 있는 iNOS의 농도의존적 발현량의 감소는 NO 분비량 감소 결과와도 관계가 있음을 나타내었다.

MAPKs 발현 억제 효과

MAPKs는 NF- κ B의 활성화에 영향을 주는 가장 대표적인 신호분자로 알려져 있으며 세포 내에서 인산화됨으로써 활

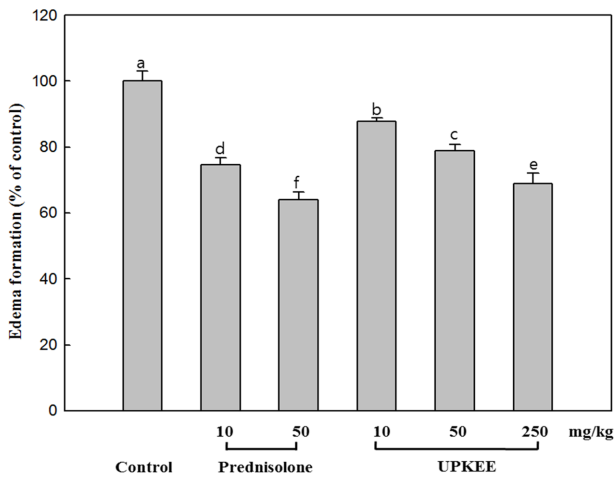


Fig. 6. Inhibition of *Ulva pertusa* Kjellman ethanol extracts (UPKEE) on croton oil-induced mouse ear edema. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

성화되고 다양한 염증매개인자의 생성에 영향을 주며[3] 염증 관련 반응이 시작되면 대식 세포내의 ERK, p38과 같은 MAPKs의 활성화가 일어나며 핵 내로 이동하여 다른 면역활성인자들을 인산화시켜 염증 반응을 더욱 활성화시킨다[6]. 따라서 MAPKs의 발현량을 Western blot으로 분석한 결과, LPS 단독 처리구에서 p38, ERK, JNK의 발현량은 모두 증가하게 나타났으며 이와 비교하여 농도별 구멍갈파래 에탄올 추출물을 처리에 의하여 LPS 단독처리구와 비교하여 각각의 신호분자들의 발현량이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 5). 특히 인산화된 p38의 발현량은 LPS 처리구의 발현량에 비하여 추출물 100 μ g/ml의 농도에서 약 43%의 비교적 높은 억제효과를 확인하였다. 이는 꽃지누아리 에탄올 추출물[11]을 이용하여 살펴본 MAPKs 발현량 억제 효과와 유사하며, 이상의 결과를 종합하였을 때 구멍갈파래 에탄올 추출물이 인산화된 MAPKs 인자들의 신호전달 경로를 효과적으로 억제함으로써 항염증의 효과를 가지는 것으로 사료된다.

귀 부종 억제효과의 조직학적 관찰

염증에는 발열증상, 혈관확장, 부종 등 여러 가지 가시적인 생리현상을 나타내며, 염증 반응 매개물질들에 의해 염증이 촉진되면 혈관의 이완 및 혈관 투과도를 증가시키고, 식균작용을 하는 과립세포, 수지상세포 및 B 세포 등을 모이게 하여 활성화시킨다. 비만세포(mast cell)는 신체의 거의 모든 조직에 존재하며 외부자극으로부터 활성화된 mast cell은 다양한 protease나 히스타민과 같은 혈관확장 물질을 분비함으로써 병원균에 대한 숙주의 방어기작과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다[21, 24]. 따라서, 합성 스테로이드제인 prednisolone 및 구멍갈파래 에탄올 추출물이 귀 부종 및 조

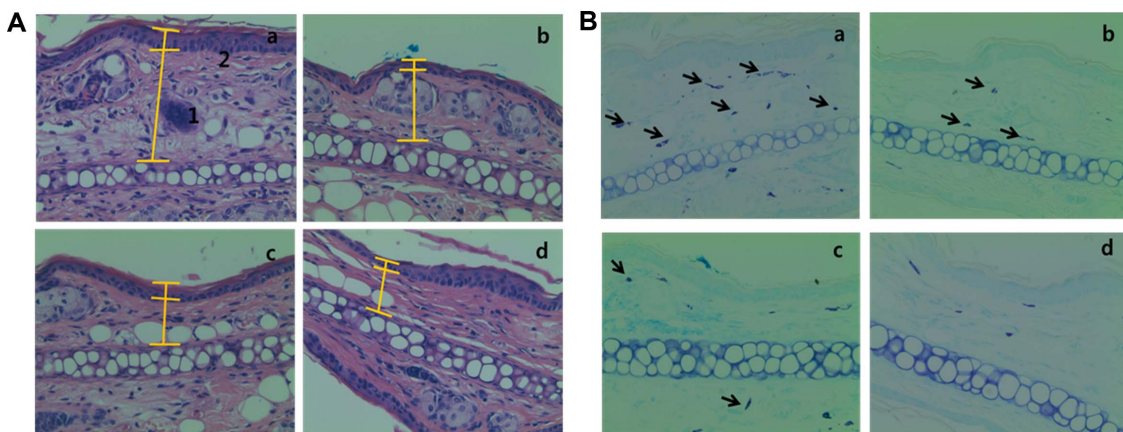


Fig. 7. Photomicrograph of transverse section $p < 0.05$ ns of mice ears sensitized with topical application of 5% croton oil (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) examined under light microscopy (magnification: $\times 200$). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b), and UPKEE 20 μ l/ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrows indicate mast cells.

직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 croton oil로 염증을 유발하고 귀 두께 측정을 실시하였다. 그 결과, croton oil을 단독으로 처리한 대조군과 비교하였을 때 두 처리구 모두 농도의존적인 귀 부종 완화 효과를 나타내었다(Fig. 6). 특히, 250 mg/kg·body weight의 구멍갈파래 에탄올 추출물 처리 시 prednisolone을 50 mg/kg·body weight 농도로 경구 투여했을 때와 유사한 정도의 귀 부종 완화 효과를 확인하였다. 마우스 귀 조직관찰의 결과, croton oil만 처리한 경우와 비교하였을 때 구멍갈파래 에탄올 추출물을 처리한 경우 경피와 진피의 두께가 얇아진 것을 확인하였다(Fig. 7). 이는 추출물을 경구투여 후 귀 두께가 감소한 결과와 유사하며, 대조구인 prednisolone 처리구 보다 더 높은 효과를 나타내었다. 이와 더불어 toluidine-blue 염색을 통하여 조직 내 mast cell 침윤 정도를 확인한 결과, 추출물의 처리 이후 mast cell의 침윤 정도가 현저히 감소함을 보였으며, 이는 귀 부종 억제 효과를 보인 것에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이 결과는 잘피 에탄올 추출물을 250 mg/kg·body weight 처리구에서 대조구인 prednisolone 50 mg/kg·body weight로 처리했을 때와 비슷한 귀 두께 감소 및 조직학적 변화를 보인 연구결과와 유사하였다[10]. 이 외에도 비틀대 에탄올 추출물[13]과 외톨개 메탄올 추출물[7]이 미치는 귀 부종의 항염증 효과에서 추출물을 250 mg/kg·body weight 처리했을 때 나타나는 귀의 부종 완화효과 연구결과와 유사한 것을 확인하였다. 그러나 합성 스테로이드제인 prednisolone은 항염제로서 많이 사용되지만 위장장애를 비롯한 다양한 부작용이 보고되고 있다[19]. 따라서 UPKEE가 보이는 항염증 효과는 해조류 에탄올 추출물에 polyphenol 계열의 화합물들이 다량 함유되어 있기 때문이라고 생각되며, 이는 prednisolone과 같은 합성제제들을 대체할 수 있는 천연 항염증제로서의 적용 가능성이 크다고 사료된다.

요 약

대식세포에 대하여 구멍갈파래 에탄올 추출물의 독성결과를 확인해본 결과 독성은 나타나지 않았으며, LPS에 의하여 유도되는 NO와 염증성 cytokine의 분비량은 구멍갈파래 에탄올 추출물의 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 또한 구멍갈파래 에탄올 추출물로 인해 NF-κB 및 MAPKs의 신호전달을 억제함으로써 염증매개성 물질의 발현 억제에 효과가 있는지 알아본 결과, 구멍갈파래 에탄올 추출물은 각각 iNOS, COX-2, NF-κB 및 MAPKs의 활성을 효과적으로 억제하였고 그에 따른 염증 매개인자들의 생성도 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. 마지막으로 추출물이 마우스 귀 부종에 미치는 영향을 살펴본 결과, 대조군의 경피와 진피의 두께에 비해 추출물 처리군의 조직 두께가 상대적으로 현저

히 줄어들었으며 귀 조직에 침윤된 mast cell의 감소에도 추출물이 그 효과를 현저하게 나타냄을 확인하였다. 본 연구 결과들을 종합해 보았을 때, 구멍갈파래의 에탄올 추출물은 항염증 활성을 가지는 새로운 천연물질로 이용 가능하여 고부가 가치 제품 개발이 가능한 천연 소재로 판단된다.

Acknowledgments

This research was a part of the project titled Yeongnam Seagrant funded by Ministry of Oceans and Fisheries, Korea.

References

1. Ayako Y, Koichi Y, Keiichi O. 1999. Iodine distribution in blades of several laminarias grown in the same sea area. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **58**: 1373-1379.
2. Azuine MA, Goswami UC, Katal JJ. 1992. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of carotenoids and dietary palm oil. *Nutr. Cancer.* **17**: 287-295.
3. Bae NY, Kim MJ, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Park JH, et al. 2015. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Gateloupia elliptica* Holmes on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells and mice ears. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 1128-1136.
4. Cho BO, Yin HH, Fang CZ, Ha HO, Kim SJ, Jeong SI, et al. 2015. Synergistic anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and luteolin in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **47**: 119-125.
5. Qin D, Zhou YI, Zhang SZ, Cao JM, Xu LY, Fang GD, et al. 2015. Anti-inflammation of *Tripterygium wilfordii* polycoride on macrophages and its regulation to inflammation via TLR4/NF-κB. *CHM* **7**: 155-161.
6. Eum WS, Lee KJ, Kim DW, Lim SS, Kang IJ, Park J, et al. 2013. Anti-inflammatory effects of extracts from *Caesalpinia sappan* L. on skin inflammation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 1513-1517.
7. Jeong DH, Kim KBWR, Kim MJ, Kang BK, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of methanol extract and nhexane fraction mojabanchromanol b from *Myagropsis myagroides*. *Life Sci.* **114**: 12-19.
8. Ji JD. 2005. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Hanyang Med. Rev.* **25**: 43-52.
9. Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, et al. 2014. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**: 729-733.
10. 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 RAW264.7 cells and mouse model. *KSBB J.* **30**: 182-190.
11. 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.* **5**: 181-187.
12. Kim MJ, Bea NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Cho YJ, et al. 2015. Anti-inflammatory effect of water extract from tuna heart on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **30**: 326-331.
 13. Kim MJ, Kim KBWR, Jeong DH, Ahn DH. 2013. Anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Sargassum sagamianum* in RAW 264.7 cells. *Food Sci. Biotechnol.* **22**: 1113-1120.
 14. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Jang MR, et al. 2016. Anti-inflammatory effect of *Chondrus nipponicus* Yendo ethanol extract on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **45**: 194-201.
 15. Lee HN, Lim DY, Lim SS, Kim JD, Park JHY. 2011. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Eupatorium japonicum*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **43**: 65-71.
 16. 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.
 17. Margret RJ, Kumaresan S, Ravikumar S. 2009. A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ulva lactuca* in rat. *J. Environ. Biol.* **30**: 899-902.
 18. Marks-Konczalk J, Chu SC, Moss J. 1998. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein and nuclear factor kappaB-binding sites. *J. Biol. Chem.* **273**: 22201-22208.
 19. Miwa K, Kambara H, Kawai C. 1983. Effect of aspirinin large doses on attacks of variant angina. *Am. Heart J.* **105**: 351-355.
 20. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.
 21. Park JH, Kwon DY, Lee SK. 2014. Effects of Hoesaeng-san ethanol extract on the human mast cell-mediated inflammatory responses. *Korean J. Oriental Physiol. Pathol.* **28**: 45-52.
 22. Ray B, Lahye M. 1995. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvaes, chlorophyta), extraction and chemical composition. *Carbohydr. Res.* **274**: 251-261.
 23. Shon DH, Choi DW, Kim MH. 2012. Improvement of anti-inflammation activity of *Gardeniae fructus* extract by the treatment of β -glucosidase. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 331-336.
 24. Tete S, Tripodi D, Rosati M, Conti F, Maccauro G, Saggini A, et al. 2008. The role of mast cells in innate and adaptive immunity. *Life Sci. J.* **18**: 891-896.
 25. Yoo JS, Cheun BS, Kim NG. 2001. Determination of Na⁺ channel blocker in seaweeds. *Korean J. Environ. Biol.* **19**: 107-112.