

## 꽃지누아리 에탄올 추출물의 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 항염증 효과

김민지<sup>1</sup> · 배난영<sup>1</sup> · 김꽃봉우리<sup>2</sup> · 박지혜<sup>1</sup> · 박선희<sup>1</sup> · 최정수<sup>3</sup> · 안동현<sup>1</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 식품공학과/식품연구소

<sup>2</sup>부경대학교 수산과학연구소

<sup>3</sup>경남정보대학교 호텔외식조리계열

### Anti-Inflammatory Effect of *Grateloupia imbricata* Holmes Ethanol Extract on LPS-Induced RAW 264.7 Cells

Min-Ji Kim<sup>1</sup>, Nan-Yong Bae<sup>1</sup>, Koth-Bong-Woo-Ri Kim<sup>2</sup>, Ji-Hye Park<sup>1</sup>,  
Sun-Hee Park<sup>1</sup>, Jung-Su Choi<sup>3</sup>, and Dong-Hyun Ahn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science and

<sup>2</sup>Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University

<sup>3</sup>Subdivision of Culinary Arts, Kyungnam College of Information and Technology

**ABSTRACT** Algae is a potential resource with various biological activities. In this study, the anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract (GIHEE) from red algae was investigated in LPS-induced RAW 264.7 cells. As a result, reduced secretion of pro-inflammatory cytokines [tumor necrosis factors- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6] and nitric oxide (NO) was observed in a dose-dependent manner. Expression of nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) as well as inducible NO synthase and cyclooxygenase-2 proteins was reduced by GIHEE, suggesting that the anti-inflammatory activity of GIHEE is related to suppression of NF- $\kappa$ B signaling pathways. In addition, GIHEE reduced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases. These results suggest that GIHEE can be used as a potential anti-inflammatory therapeutic.

**Key words:** *Grateloupia imbricata* Holmes, anti-inflammation, NF-kappaB, MAPKs

## 서 론

염증반응은 물리적, 화학적 외부 자극이나 세균 감염 등에 의한 다양한 기질 변화에 대응하기 위해 인체에서 일어나는 정상적인 방어 작용이다. 하지만 지속적인 염증반응은 오히려 조직의 손상을 촉진하고 관절염, 당뇨병, 동맥경화 등과 퇴행성 면역질환의 원인이 된다(1). 염증반응의 대표적 증상으로는 열, 부종, 홍반 등이 있으며 이는 손상된 부위를 회복시키는 생체 방어 기작으로 염증매개인의 활성화에 따라 나타난다(2). 대식세포는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 하며 lipopolysaccharide(LPS)의 자극에 의하여 활성화되어 interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 및 IL-1 $\beta$  등의 염증매개 사이토카인을 생성하여 염증반응에 관여하게 된다(3). 또한 활성화된 대식세포는 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)와 같은 효소를 생산하며 각각 nitric

oxide(NO) 및 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)와 같은 다양한 염증매개체를 생산하여 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려졌다(4). 특히 과도한 NO의 생성은 염증반응을 촉진할 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진함으로써 염증을 심화시켜 조직 손상, 유전자 변이 및 신경 손상을 일으킨다고 보고된다(5). 이처럼 다양한 염증매개체들의 발현은 전사인자인 nuclear factor-kappaB(NF- $\kappa$ B), mitogen-activated protein kinase(MAPK)를 포함한 여러 가지 염증매개 신호 네트워크의 활성화를 통하여 외래인자의 탐식작용을 활성화하고 염증반응에 관여하게 된다(6). 따라서 이들의 생성을 저해하고 조절할 수 있는 물질은 염증질환을 치료하거나 예방하는 자원으로 활용될 수 있다(7).

지금까지 염증질환 치료제로서 주로 사용된 항염증제는 대부분이 스테로이드 및 비스테로이드성이며 이와 같은 항염증제들은 장기간 사용 시 부작용의 위험이 커 이를 대체하기 위한 천연물 유래 항염증제체의 개발이 많이 이루어지고 있다(8). 해양생물은 항염증, 항암, 면역증진 및 항바이러스 등의 다양한 생리활성을 갖는 물질들을 함유하고 있어 새로운 의약품, 화장품 및 기능성 식품을 개발하기 위해 꾸준히 연구되고 있다(9). 현재까지 보고된 홍조류의 항염증 효과에 관한 연구로는 참도박 에탄올 추출물의 항염증 효과(10),

Received 5 November 2015; Accepted 24 December 2015

Corresponding author: Dong-Hyun Ahn, Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr, Phone: +82-51-629-5831

김 추출물에 의한 대식세포의 항염증 효과(11) 등이 대표적이며 약 120여 종에 달하는 다양한 홍조류에 비해 이들의 생리활성에 대한 연구는 아직 매우 미흡한 수준이다.

홍조류인 꽃지누아리(*Grateloupia imbricata* Holmes)는 지누아리과(Halymeniaceae)에 속하며, 형태적 특징은 적갈색 또는 황갈색의 가죽질 또는 연골질로 짧은 막대 모양의 줄기에서 납작하게 부채 모양으로 넓어지며 두세 갈래로 갈라지고 끝부분의 가장자리는 컷불 모양의 돌기를 내며 조금 비틀거린다(12). 이는 Holmes(13)가 일본에서 서식하고 있는 꽃지누아리에 대해 처음 소개하였으며, 국내에서는 남해안 및 제주도 연안에 주로 서식하고 있다. 꽃지누아리에 관한 연구는 지리적 특성에 따른 지누아리(*Grateloupia*)속의 계통 분류에 대해 주로 보고가 되고 있으나(14,15), 생리활성에 관한 연구는 미미한 편이다. 따라서 본 연구에서는 꽃지누아리를 대상으로 에탄올 추출물로부터 항염증 활성을 확인하고, 염증성 질환의 예방과 치료제 개발의 기초자료 탐색 및 식품산업에서 항염증 활성을 갖는 기능성 식품으로의 가능성을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 꽃지누아리(*Grateloupia imbricata* Holmes)는 부산 기장군 연화리에서 채취한 것으로 담수로 깨끗하게 수세한 후 동결건조 하여 분말화하고 진공 포장상태로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하며 사용하였다.

### 에탄올 추출물의 제조

꽃지누아리 건조 분말에 10배의 95% 에탄올을 가하고, 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 24시간 동안 상온에서 교반하여 추출하였다. 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 취하였고, 이후 남은 잔사를 이와 같은 방법으로 2회 반복 추출하였다. 추출한 상층액은  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하였으며, 농축하여 건조된 시료는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하며 실험에 이용하였다.

### 세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포(KCLB 40071)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배양액을  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

### 세포독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등(16)의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다(12). RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^6$  cells/mL 농도로 well plate에 분주하고 20 시간 전 배양 후,  $1 \mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 꽃지누아리 에탄올 추출물(GIHEE)을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )로 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator(MCO-15AC, Sanyo)에서 22 시간 본 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하고 2시간 재배양하였다. 이를  $4^{\circ}\text{C}$ , 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 그 후 각 well에 dimethyl sulfoxide를 첨가하고 이를 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, Richmond, VA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다. 세포독성능은 다음 식에 의해 계산하였다.

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

### Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess 반응을 이용하여 측정하였다(17). RAW 264.7 세포는 DMEM 배지를 이용하여  $2.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 20시간 전 배양하였다. 세포에  $1 \mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 GIHEE를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리하여 24시간 재배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide+ 0.1% naphthalenediamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

### 염증성 사이토카인 분비량 측정

LPS에 의해 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포로부터 생성된 염증 관련 사이토카인의 분비량을 측정하기 위해 DMEM 배지를 이용하여  $2.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 18시간 전 배양한 후  $1 \mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 GIHEE를 처리하여 12시간 재배양하였다. 세포배양액 내의 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  사이토카인의 분비량을 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 를 분주하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 coating 시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤 각 microplate에 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시

켰다. 반응 후 PBST로 세척하고 희석한 biotinylated anti-mouse TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 분주하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBST로 세척하고 OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응시켰다. 반응 종료를 위해 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 분주한 뒤 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### iNOS, COX-2, phospho-NF- $\kappa$ B p65 및 NF- $\kappa$ B p65 발현량 측정

세포질 내 생성되는 iNOS, COX-2, phospho-NF- $\kappa$ B p65 및 세포핵 내 NF- $\kappa$ B p65의 발현량에 GIHEE가 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot을 이용하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 Sheeba와 Asha(18)의 방법에 따라 실험을 진행하였다. iNOS, COX-2, phospho-NF- $\kappa$ B p65의 경우 cytosol lysis buffer[50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40]를 이용하였으며, NF- $\kappa$ B p65의 경우 nucleus lysis buffer(10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol)를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후 15,520 $\times$ g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질을 정량하였으며 30  $\mu$ L의 lysate를 Laemmli(19)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등(20)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, phospho-NF- $\kappa$ B p65 및 NF- $\kappa$ B p65의 발현량을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2, phospho-NF- $\kappa$ B p65 및 NF- $\kappa$ B p65를 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.

### MAPKs(JNK, ERK, p38) 발현량 측정

MAPKs의 발현량을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL로 18시간 전 배양하고 GIHEE를 처리하여 30분 동안 본 배양한 후 iNOS, COX-2 및 NF- $\kappa$ B와 같은 방법으로 이후의 실험을 진행하였다. 인산화된 p38 protein kinase(p38), extracellular signal-regulated kinase(ERK),

c-Jun N-terminal kinase(JNK) 및 p38, ERK, JNK의 발현량을 검토하기 위하여 anti-mouse p-p38, p-ERK, p-JNK, p38, ERK, JNK(Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA) 항체를 1:500으로 희석하여 사용하였다.

### 통계 처리

실험 결과의 통계 처리는 SAS program(Statistical Analytical System V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 평균값을 분산분석한 후, Duncan의 다중검정법으로  $P < 0.05$  수준에서 항목 간의 유의적 차이를 검정하였다.

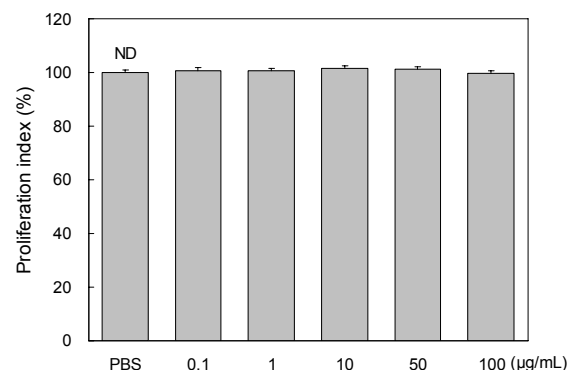
## 결과 및 고찰

### 세포독성

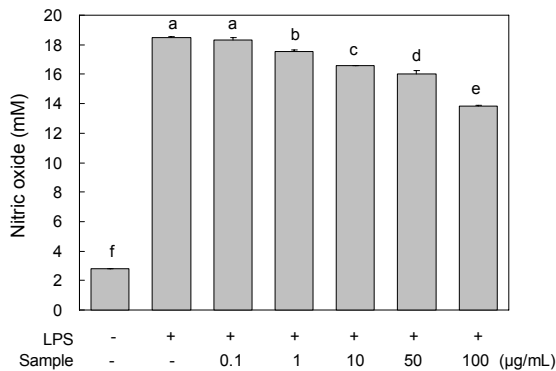
RAW 264.7 세포의 생존율을 MTT assay를 통해 측정하여 GIHEE 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100  $\mu$ g/mL) 세포독성을 비교하였다(Fig. 1). 그 결과 모든 처리 농도에서 negative control 군과 비교 시 세포 생존율이 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인하였다. 따라서 GIHEE가 RAW 264.7 세포에 독성을 보이지 않는 것을 확인하고 0.1, 1, 10, 50 및 100  $\mu$ g/mL 농도의 GIHEE를 처리하여 항염증 활성에 대해 측정하였다.

### NO 생성량 측정

NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 혈관확장 등 다양한 생리기능을 가지고 있으며 NO를 형성하는 iNOS들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환하면서 NO를 생성하고 이는 병리적인 반응에서 중요한 작용이다(21). 체내에 생성된 NO는 적절한 수준에서는 혈소판억제, 면역조절, 신경전달, 혈관확장 등의 역할을 하지만 과도한 NO의 증가는 염증성



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



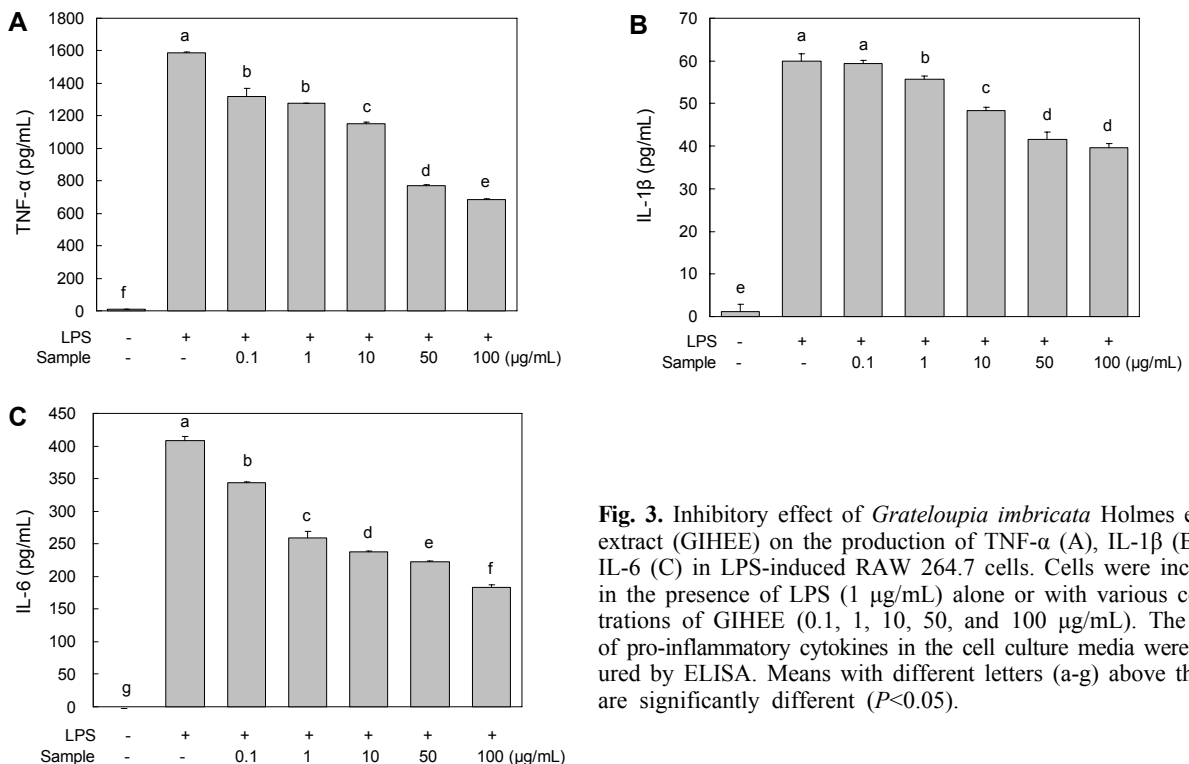
**Fig. 2.** Inhibitory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract (GIHEE) on the production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) alone or in combination with GIHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h. The culture media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

질환을 발생시킬 수 있으며 산소와 결합하여 생성된 peroxynitrite는 세포와 조직에 산화적 손상을 입히게 된다(22). 따라서 생리적 수준의 NO 농도를 유지하는 것은 매우 중요하며, 본 연구에서는 GIHEE의 항염증 효과를 확인하기 위하여 LPS를 이용하여 RAW 264.7 세포에 염증을 유도해 NO를 과량 생성하는 조건을 만들고 GIHEE를 처리하여 NO 생성이 억제되는지 관찰하였다(Fig. 2). LPS 단독 처리군은 LPS를 처리하지 않은 처리군에 비해 약 84% 이상 증가하여 LPS에 의하여 염증반응이 충분히 활성화가 된 것을 알 수

있었다. LPS와 GIHEE를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL)로 함께 처리한 군에서는 NO 생성 억제 활성을 보였으며, 100 µg/mL로 처리하였을 경우 LPS 처리군과 비교 시 약 25% 감소함을 보였다. 이는 홍조류인 방사무늬 김 추출물에 의한 항염증 효과에서 NO 생성량이 감소한 결과와 유사하였다(14).

### 염증성 사이토카인 분비량 측정

인체 내 염증반응에서 분비되는 대표적인 전염증성 cytokine에는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6가 있다(23). 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ 는 중앙세포를 파괴하는 물질로 알려졌으며 암축진 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다(24). 또한 IL-1 $\beta$ 는 국소 염증반응을 매개하는 물질이며, IL-6는 T세포의 활성화 및 염증매개물질의 발현을 통해 후천성 면역을 개시하는 물질이다(25). 따라서 인체 내 염증반응에서 이들 전염증성 사이토카인들의 발현량을 조절하는 것은 중요하다. 본 실험에서는 대식세포인 RAW 264.7 세포로부터 염증성 사이토카인의 발현 정도를 ELISA kit을 통해 알아보았다. 그 결과(Fig. 3A-C) LPS를 처리한 대조군에서는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 분비량이 각각 1,584.51, 59.95 및 407.78 pg/mL로 높은 분비량을 보였으나 GIHEE를 처리하였을 경우 그 분비량이 농도 의존적으로 감소함을 나타내었다. 특히 GIHEE 50 µg/mL 농도에서 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  분비량이 각각 약 51% 및 30% 이상 감소함을 보였으며, IL-6 분비량은 가장 높은 처리 농도인 100 µg/mL에서 약 54% 이상의 분비량 감소를 나타내었다. 이는 홍조류에 속하



**Fig. 3.** Inhibitory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract (GIHEE) on the production of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), and IL-6 (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 GIHEE (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-g) above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

는 우뚝가사리의 RAW 264.7 대식세포의 항염증 효과에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성이 농도 의존적으로 감소한 결과와 유사하였다(26).

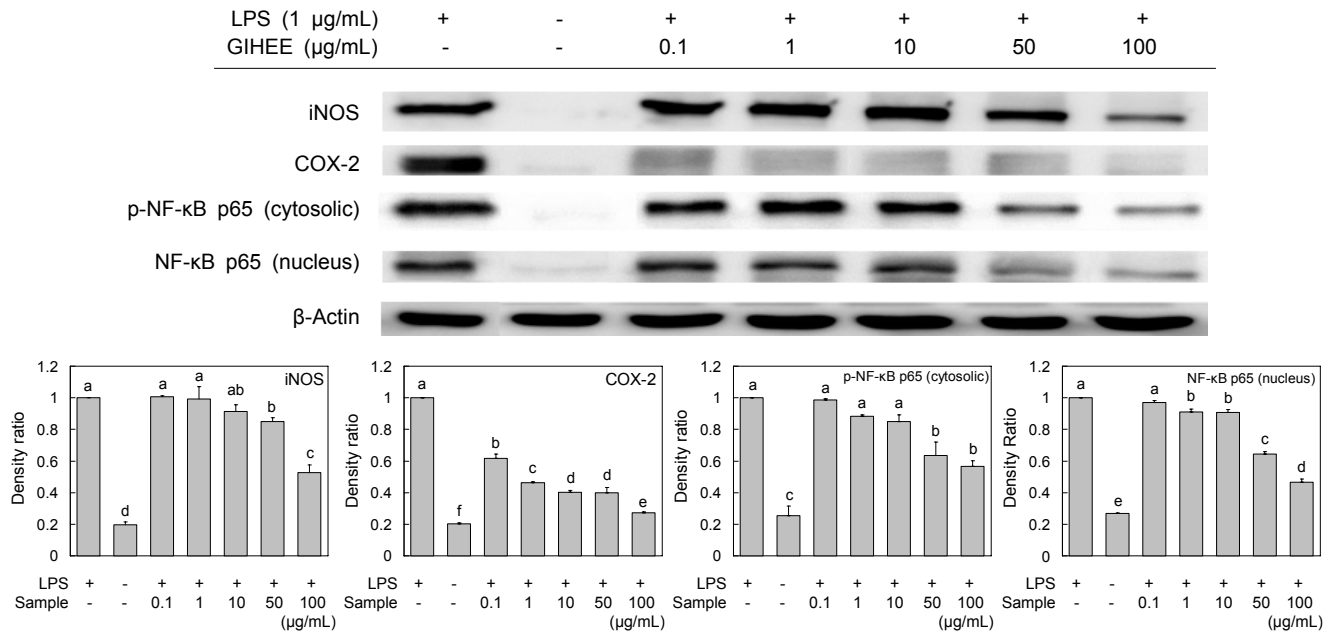
**iNOS, COX-2 발현에 미치는 영향**

iNOS는 평소에는 세포 내 존재하지 않으나 외부자극으로 유도된 iNOS는 장시간 다량의 NO 분비를 촉진하며, 생성된 NO는 조직의 손상, 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진할 뿐 아니라 염증매개성 물질들의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시킨다(27). 이와 더불어 iNOS의 발현은 NF- $\kappa$ B의 활성화로 유도되며, 염증반응에서 염증매개물질들이 과잉 생산되는 신호전달에 중요한 역할을 한다. 또한 COX-2는 cytokine, 자외선, 세균성 내독소 등에 의해 과잉 발현되어 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 영향을 미치며, 특히 COX-2의 생성 및 활성 저해로 인해 체내에 발생하는 PGE<sub>2</sub> 등의 염증인자 등과 관련된 염증반응을 촉진한다(28). 따라서 본 실험에서는 GIHEE가 세포질 내에서의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot 방법을 시행하였다. 그 결과 RAW 264.7 세포에 LPS(1  $\mu$ g/mL)를 처리하였을 경우 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현이 확연히 증가하였고, GIHEE 처리로 단백질 발현이 감소한 것을 확인하였다(Fig. 4). 이는 NO 생성 억제와 견주어 보았을 때 NO의 분비량 억제 기전이 iNOS의 발현 억제를 통해 이루어진 것으로 여겨진다. 이는 참도박 에탄올 추출물의 항염증 효과에서 추출물 50 및 100  $\mu$ g/mL 농도 처리

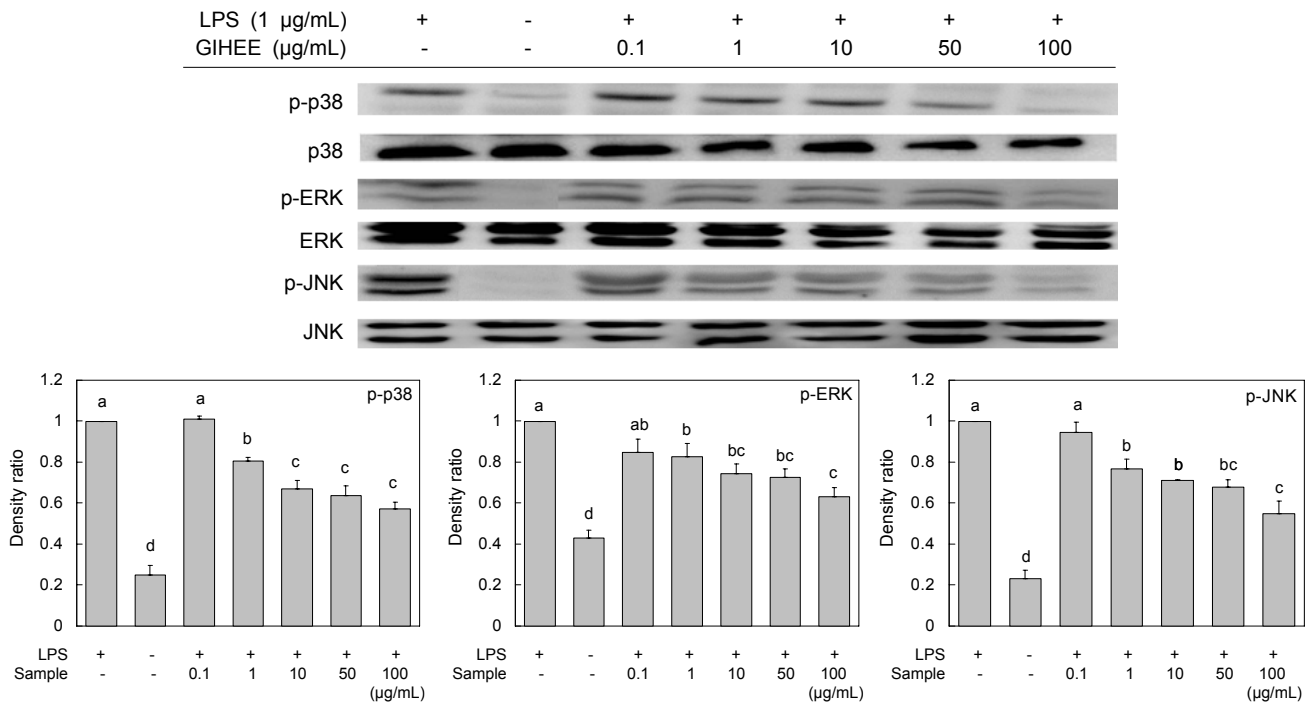
시 iNOS 및 COX-2에 있어서 약 60% 이상의 억제 효과를 나타낸 연구 결과와 유사하다(10).

**NF- $\kappa$ B p65 활성화에 미치는 영향**

염증반응에 있어 NF- $\kappa$ B는 iNOS 및 COX-2의 발현을 조절하는 것으로 보고되며, LPS, TNF- $\alpha$  또는 외부자극으로 활성화된 NF- $\kappa$ B p65는 세포핵 내로 이동되어 전사조절 인자로서 작용하면서 염증매개물질들의 과잉 생산에 중요한 신호전달 경로로 알려졌다(29). 세포핵 내에 NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ -B와 결합하여 존재하는데 외부자극으로 활성화되면 I $\kappa$ -B의 인산화가 이루어지고 자유로워진 NF- $\kappa$ B는 세포핵 내로 이동하여 전사인자로서 염증반응을 촉진하게 된다(28). 본 연구에서 GIHEE에 의한 세포질에서의 인산화된 NF- $\kappa$ B p65 및 핵 내에서의 NF- $\kappa$ B p65의 발현량 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 인산화된 NF- $\kappa$ B p65 및 NF- $\kappa$ B p65는 LPS 처리로 증가하였으며, GIHEE 처리 시 농도가 증가함에 따라 발현이 감소하였다. 특히 50 및 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현이 효과적으로 억제됨을 확인하였다. 이 결과는 GIHEE가 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 NF- $\kappa$ B signaling을 저해하고 전사인자로부터 증가하는 다양한 염증매개물질이 단백질 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 보인 것으로 생각된다. 이는 잔가시 에탄올 추출물의 항염증 효과에서 50 및 100  $\mu$ g/mL 농도 처리구와 PBS 처리구와 유사한 발현량을 보여 우수한 항염증 효과를 보인 결과와 유사하다(30).



**Fig. 4.** Effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract (GIHEE) on LPS-induced iNOS, COX-2, phospho-NF- $\kappa$ B p65 (cytosolic), and NF- $\kappa$ B p65 (nucleus) expression in LPS-induced RAW 246.7 cells. The levels of iNOS, COX-2, and phospho-NF- $\kappa$ B p65 in the cytosolic protein and the NF- $\kappa$ B p65 in nuclear protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of GIHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100  $\mu$ g/mL) and LPS (1  $\mu$ g/mL) for 18 h or 30 min and the proteins were detected using specific antibodies. For quantification, the expression data were normalized to the  $\beta$ -actin signal. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract (GIHEE) on MAPKs expression in LPS-induced RAW 264.7 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 GIHEE (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 total MAPKs signal. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### MAPKs(JNK, ERK, p38) 활성화 억제 효과

MAPKs는 JNK, ERK, p38의 신호전달 경로로 구성되며 세포성장과 분화의 조절, 사이토카인과 스트레스에 대한 세포반응 조절에서 중요한 역할을 한다. 활성화된 MAPKs는 NF- $\kappa$ B 활성화에 관여하여 iNOS, COX-2 및 전염증성 매개물질의 발현에 관여한다(31). 활성화된 ERK는 다양한 전사인자를 인산화할 수 있으며, JNK 신호전달 경로는 LPS나 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증유발 인자에 반응하는 세포에서 활성화되고 세포의 형태적 증대와 사이토카인의 전사에 관여한다(32). 따라서 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에 대해 GIHEE가 JNK, ERK, p38의 인산화에 미치는 영향을 살펴본 결과(Fig. 5) LPS 처리군에서는 대조군보다 발현량이 확연히 증가하였으나, LPS와 GIHEE를 함께 처리한 경우 LPS 처리군에 비해 MAPKs의 인산화가 농도 의존적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 이 결과는 잘피 에탄올 추출물의 항염증 활성 효과에서 추출물 농도 의존적으로 MAPKs의 인산화 농도가 감소함을 보인 것과 유사하다(33). 위의 결과를 종합해볼 때 GIHEE 처리가 LPS로 유도된 염증성 사이토카인, iNOS 및 COX-2와 같은 상기 인자들의 활성화와 관련하여 MAPKs 신호전달 경로를 효과적으로 억제함으로써 항염증 작용을 하는 것으로 보인다.

### 요 약

본 연구에서는 홍조류인 꽃지누아리 에탄올 추출물(GIHEE)의 항염증 활성을 확인하기 위해 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 분비되는 염증매개성 물질들의 발현량 억제를 관찰하여 추출물의 항염증 활성을 탐색하고자 하였다. 그 결과 GIHEE 50 및 100  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리 시 LPS로 유도된 염증반응에서 NF- $\kappa$ B 활성 억제와 더불어 MAPKs의 인산화를 효과적으로 억제함을 보였다. 염증반응 매개인자들인 NO 및 염증성 사이토카인의 생성도 효과적으로 제어함을 보였으며, 특히 GIHEE 50  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  분비량은 각각 약 51% 및 30% 이상, IL-6 분비량은 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 54% 이상의 높은 분비량 감소를 나타내었다. 따라서 GIHEE는 이들 염증매개성 물질들의 활성을 효과적으로 억제함으로써 항염증 활성을 나타내었으며, 염증성 질병의 예방 및 치료에 효과적인 기능성 소재로의 가능성이 충분하다고 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2015년도 정부(해양수산부) 재원으로 영남씨그랜트 센터의 지원을 받아 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- de Heredia FP, Gomez-Martinez S, Marcos A. 2012. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc* 71: 332-338.
- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6: 347-373.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144: 1425-1431.
- 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.
- Hippeli S, Elstner EF. 1999. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radic Res* 31: S81-S87.
- Choi C, Cho H, Park J, Cho C, Song Y. 2003. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in Raw 264.7 macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1916-1922.
- Cho HJ, Shim JH, So HS, Yoon Park JH. 2012. Mechanism underlying the anti-inflammatory action of piceatannol induced by lipopolysaccharide. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1226-1234.
- 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 responses in RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 46: 729-733.
- Kim SK, Wijesekera I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J Funct Foods* 2: 1-9.
- Bae NY, Kim MJ, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Park JH, Park SH, Ahn DH. 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.
- Lee JY, Choi JW, Lee MK, Kim YM, Kim IH, Nam TJ. 2014. Anti-inflammatory effects of *Pyropia yezoensis* extract in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor J Fish Aquat Sci* 47: 757-764.
- Lee YP. 2008. *Marine algae of Jeju*. Academy Publishing Co., Seoul, Korea. p 385.
- Holmes EM. 1896. New marine algae from Japan. *J Linn Soc Bot* 31: 248-260.
- Lee JI, Kim HG, Geraldino PJJ, Hwang IK, Boo SM. 2009. Molecular classification of the genus *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Korea. *Algae* 24: 231-238.
- García-Jiménez P, Geraldino PJJ, Boo SM, Robaina RR. 2008. Red alga *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae), a species introduced into the Canary Islands. *Phycol Res* 56: 166-171.
- 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- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 29: 985-990.
- Yee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extracts in mouse macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.
- Sheeba MS, Asha VV. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF- $\alpha$  and iNOS expression, which is mediated by NF- $\kappa$ B regulation, in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 124: 39-44.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 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 U S A* 76: 4350-4354.
- Lee HJ, Lee CW, Choi MS, Son DJ, Hong JT. 2006. Effects of esthetic essential oils on LPS-induced nitric oxide generation in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 32: 111-116.
- 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 RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 888-894.
- Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. 2012. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J Plant Res* 25: 299-307.
- Dinarello CA. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-508.
- McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 24-32.
- Choi WS, Kim YS, Lee SH, Chai KY, Lee YH. 2009. Anti-inflammatory effects of *Gelidium amansii* in RAW 264.7 macrophages. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 23: 673-677.
- Liden J, Rafter I, Truss M, Gustafsson JA, Okret S. 2000. Glucocorticoid effects on NF- $\kappa$ B binding in the transcription of the ICAM-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 1008-1014.
- Chun KS, Surh YJ. 2004. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 15: 1089-1100.
- Tak PP, Firestein GS. 2001. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7-11.
- Jeong DH, Kim KBWR, Kim MJ, Kang BK, Ahn DH. 2013. Anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Sargassum micracanthum*. *J Microbiol Biotechnol* 23: 1691-1698.
- Celec P. 2004. Nuclear factor kappa B—molecular biomedicine: the nest generation. *Biomed Pharmacother* 58: 365-371.
- Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK. 2005. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* 50: 235-246.
- Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Cho YJ, Ahn DH. 2015. Anti-inflammatory effect of *Zostera marina* ethanolic extract on LPS-induced RAW264.7 cells and mouse model. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 30: 182-190.