

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 가락진두발 에탄올 추출물의 항염증 효과

김민지¹ · 배난영¹ · 김꽃봉우리² · 박지혜¹ · 박선희¹ · 장미란³ · 안동현¹

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³식품의약품안전처 건강기능식품정책과

Anti-Inflammatory Effect of *Chondrus nipponicus* Yendo Ethanol Extract on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells

Min-Ji Kim¹, Nan-Yong Bae¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Ji-Hye Park¹,
Sun-Hee Park¹, Mi-Ran Jang³, and Dong-Hyun Ahn¹

¹Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science and

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University

³Health Functional Food Policy Division, Ministry of Food and Drug Safety

ABSTRACT The anti-inflammatory activity of ethanol extract from *Chondrus nipponicus* Yendo (CNYEE) was investigated by measuring production of a lipopolysaccharide-induced inflammatory response mediator. CNYEE had no cytotoxic effects on proliferation of macrophages compared to the control. CNYEE significantly inhibited (over 50%) NO production at 50 µg/mL, with inhibitory effects on expression levels of cytokines such as interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α), and IL-1β. In particular, IL-6 inhibitory activity of CNYEE was higher than 70% at 100 µg/mL. CNYEE also reduced protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and nuclear factor (NF)-κB in a dose-dependent manner. CNYEE also significantly reduced phosphorylation of p38, extracellular signal-regulated kinase, and c-Jun N-terminal kinase. Therefore, these results suggest that CNYEE may have anti-inflammatory effects by modulating the NF-κB and mitogen-activated protein kinases signaling pathways and may be used as an anti-inflammatory therapeutic material.

Key words: *Chondrus nipponicus* Yendo, anti-inflammatory, cytokine, MAPKs

서론

염증반응은 생체에 이물질이 감염 또는 침입하였거나 물리 화학적 손상을 입었을 때 이를 방어하기 위한 현상이다. 염증반응을 유발하는 다양한 요인 중에는 세균에 의한 것이 가장 많으며 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins(PG), hydroxyeicosatetraenoic acid, leukotriene과 같은 혈관 생성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 붉어지면서 붓고 열이나 통증이 나타나고 염증반응이 일어나게 된다. 하지만 과도하게 염증반응이 일어날 시에는 기능장애와 같은 조직 변질 순환장애와 조직 증식을 유발한다(1). 다량의 초기 염증반응 유도 cytokine이나 염증매개물질들에 의해 혈관 내피세포에 세포 접합 분자의 발현을 증가시킨다. 염증인자는 염증자

극에 반응하여 세포 내 신호전달 경로와 전사인자가 활성화되며 발현되게 되는데 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 일차적인 자극 때문에 발생한다(2). LPS는 gram-negative bacteria의 세포벽 외층의 절편혼합물로서 인체 내에서 내독소로 작용하여 국소 및 전신의 염증반응을 유발하며, 대식세포의 TLR 4(toll-like receptor 4)와 결합하고 MyD88을 통하여 IRAK의 인산화 및 TRAF6가 활성화되어 IκB kinase cascade에 의해 다양한 cytokine을 생성시키므로 염증 연구에서 다용되는 모델이다(3). Nuclear factor-κB(NF-κB)는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 전사인자로 p50과 p65로 구성되어 인산화됨에 따라 핵 내로 이동해 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2) 및 염증관련 cytokine을 합성한다(4). 한편 NF-κB는 extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun N-terminal kinase(JNK), p38 kinase(p38)를 포함하는 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)에 의해서도 조절되는 것으로 알려졌다(4).

이러한 경로를 통해 발생하는 염증이 치유되지 않고 만성으로 진행될 때는 조직 손상이 이루어지고 일부에서는 암

발생 등의 질환까지 유발되기도 한다(5). 이러한 염증반응을 억제하기 위하여 기존에 이용되던 합성 항염증제의 경우 일시적으로 증상을 완화하나 과량 사용 시 위궤양이나 위염, 심장혈관질환 등과 같은 부작용이 심각한 문제점으로 보고되어 있다. 이에 염증 유발 경로에 관여하여 염증반응을 완화시키는 천연 소재를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(6,7).

한편 천연물인 해조류는 고지혈증 개선(8), 콜레스테롤 침착 방지(9), 항균(10) 등의 생리활성이 보고되고 있어 최근 각광받고 있는 천연물이다. 그중 가락진두발(*Chondrus nipponicus* Yendo)은 홍조류 돌가사리과 해조류로 다른 홍조류의 생리활성에 관한 연구(11-13)에 비해 가락진두발에 관한 생리활성 연구는 거의 전무한 실정이다. 본 연구에서는 가락진두발 에탄올 추출물이 LPS로 자극한 대식세포에서 NF- κ B와 MAPKs pathway의 전사 활성 저해를 통해 나타내는 항염증 효과를 확인하고 천연 염증 치료제로써 이용 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 가락진두발은 연화리에서 채취한 것으로 담수로 깨끗하게 수세한 후 동결 건조하여 분말화하고 진공 포장상태로 -20°C에서 저장하며 사용하였다.

에탄올 추출물의 제조

분말상태의 가락진두발은 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 10배 양의 95% 에탄올로 24시간 추출하였으며 추출물은 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)로 상층액을 취하였다. 남은 잔사는 같은 방법으로 2회 반복하여 추출하였고, 상층액은 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 37°C에서 건조한 후 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 건조된 농축물은 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 녹인 후 phosphate buffered saline(PBS)을 이용하여 농도별로 희석하여 본 실험에 사용하였다.

세포배양

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

세포독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등(14)의 방법을

약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를 1×10⁴ cells/mL의 농도로 96-well plate에 분주하고 20시간 전 배양하여 가락진두발 에탄올 추출물(CNYEE)을 농도별로(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL) 첨가한 후 22시간 분 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하고 2시간 재배양하였다. 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 걸어내고 DMSO 100 μL를 분주하여 생성된 formazan을 녹여내 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다. 세포 증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

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

Nitric oxide(NO) 생성량 측정

배양액 내의 nitrite 농도를 측정하기 위해 Griess 반응(15)을 이용하였다. RAW 264.7 세포를 2.5×10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 그 후 CNYEE를 0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL 처리하고 1 μg/mL의 LPS로 자극하여 24시간 분 배양하였다. 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 얻어 정량 실험에 사용하였다. 상층액은 Griess 시약(1% sulfanilamide+ 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)과 1:1로 상온에서 10분간 반응시켜 microplate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

Pro-inflammatory cytokines 분비량 측정

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

idase conjugate를 분주하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBST로 세척하고 OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65 발현량 측정

CNYEE가 세포질 내 생성되는 iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 배양하였다. RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cells/mL로 18시간 전 배양한 후, 0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL 농도별 CNYEE와 1 μ g/mL의 LPS를 처리하여 iNOS와 COX-2는 18시간, NF- κ B p65는 30분 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS로 세척한 후 Sheeba와 Asha(16)의 방법에 따라 iNOS 및 COX-2의 경우 cytosolic lysis buffer[50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40]를 이용하였으며, NF- κ B의 경우 nucleus lysis buffer(10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol)를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질을 정량하였으며 30 μ L의 lysate를 Laemmli(17)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등(18)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 발현량을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65를 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, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다.

MAP kinase 발현량 측정

MAPKs의 발현량을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cells/mL로 18시간 전 배양한 후, 0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL 농도별 CNYEE와 1 μ g/mL의 LPS를 처리하여 30분 동안 배양하고 iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65와 같은 방법으로 이후의 실험을 진행하였다. 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 Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA) 항체를 1:500으로 희석하여 사용하였다.

통계 처리

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

결과 및 고찰

RAW 264.7 세포에 미치는 가락진두발 에탄올 추출물의 세포독성

가락진두발 에탄올 추출물을 농도에 따라(0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL) RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 세포 생존의 변화 여부를 MTT assay를 이용해 측정한 결과, PBS 처리군과 비교 시 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(Fig. 1). 이를 통해 가락진두발 에탄올 추출물은 0.1~100 μ g/mL에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 독성이 없는 것으로 생각하여 이 농도에서 염증 억제 활성을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 이는 큰잎모자반의 세포독성 실험에서 농도의존적으로 세포독성이 나타나지 않은 결과(19) 및 참도박 에탄올 추출물의 세포독성 실험에서 독성을 나타내지 않은 결과와 유사하다(13).

Nitric oxide 생성 억제 효과

NO는 반응성이 강한 이원자 자유라디칼로 인체 내 생리적이거나 병적인 반응에서 중요한 물질로서 L-arginine을 기질로 하여 NOS에 의해 L-citrulline으로 합성되며 적절한 수준에서는 혈소판 억제, 면역조절, 신경전달, 혈관확장 등의 역할을 하지만 NO가 과량으로 생성되면 염증반응을 촉진하고 면역질환을 포함한 관절염, 기관지염, 다발성 경화증과 같은 병적반응을 일으킨다(20,21). 본 연구에서는 가락진두발 에탄올 추출물의 NO 생성 억제 효과를 알아보기 위

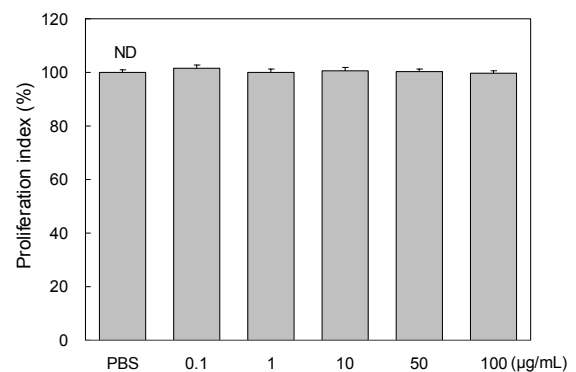


Fig. 1. Effect of *Chondrus nipponicus* Yendo ethanol extract on proliferation in RAW 264.7 cells. Proliferation index (%)=(sample O.D./ control O.D.)×100. ND: not significantly different.

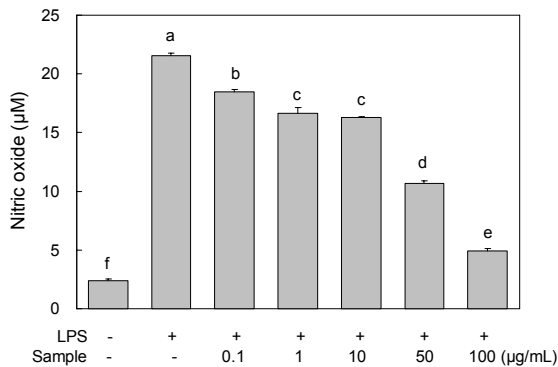


Fig. 2. Effect of *Chondrus nipponicus* Yendo ethanol extract (CNYEE) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) alone or in combination with CNYEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure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

하여 LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 세포에서의 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 세포의 NO 생성량을 확인한 결과, LPS만으로 염증을 유발하였을 때 NO 생성량이 21.56 ± 0.22 µM로, 아무것도 처리하지 않은 PBS 처리구의 2.38 ± 0.15 µM보다 약 9배 증가함을 보였다. CNYEE를 처리하였을 때 LPS 단독처리구와 비교하여 농도 의존적으로 생성량을 유의성 있게 감소시킨 것을 확인하였다(Fig. 2). 특히 비교적 낮은 농도인 50 µg/mL에서 50% 이상의 억제 효과를 나타냈다. 본 연구 결과는 홍조류인 참도박 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 NO 생성량의 감소를 보인 결과(13) 및 잘피 에탄올 추출물의 NO 저해능을 확인한 연구 결과(22)와 유사함을 확인하였다. 따라서 CNYEE는 LPS로 유도된 대식세포에서 증가한 NO의 생성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Pro-inflammatory cytokines 생성 억제 효과

LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 CNYEE를 농도별로 처리하여 pro-inflammatory cytokine IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 분비량 변화를 ELISA kit을 이용하여 정량하였다. LPS는 대식세포의 활성화에 관여하는 대표적인 mitogen으로 RAW 264.7 세포에 처리하면 대식세포의 표면 수용체인 TLR 4에 결합하여 반응하게 된다(23). 이러한 LPS에 의해 생성되는 주요 pro-inflammatory cytokine으로 IL-1β, TNF-α 및 IL-6 등이 있는데 이러한 cytokine의 발현은 PGE₂와 NO의 발현으로 이어지게 되고 과도한 pro-inflammatory cytokine의 분비량 증가는 전신성 염증반응 증후군, 패혈증 및 심한 조직 손상을 야기한다(24,25). 그중 IL-6는 T cell, monocyte, macrophage, synovial fibroblast 등의 면역세포에서 발현되는 염증성 cytokine으로 세

포 활성화를 유도하고 비만세포로부터 분비되어 알레르기 염증반응을 통해 사람의 천식과 동물의 수동피부를 유발하는 데 기여한다(26). TNF-α는 염증반응 과정 중 초기 주요 내인성 매개자로서 염증 부위로의 백혈구를 증가시키는 다른 염증성 cytokine과 내피세포 부착 분자의 발현이 증가하여 T cell과 대식세포를 활성화해 자가 면역 반응을 발생시키기 때문에 지속적인 염증반응에 있어 주요한 cytokine이다(27). 또한 IL-1β는 염증반응 시 생성되는 촉진성 cytokine으로 낮은 농도에서는 세포성장이나 항상성 유지에 필수적이지만 염증반응 및 면역적 자극으로 대량생산될 경우 T cell을 활성화하고 B cell을 성숙시켜 증상을 악화시킨다(28). 따라서 이러한 염증성 cytokine을 조절하는 물질은 염증반응으로 유도된 다양한 질병을 조절할 가능성이 있음을 알 수 있다. 본 연구에서 CNYEE가 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 분비량을 확인하였다. IL-6의 분비량은 LPS 처리 시 약 441 pg/mL로 PBS 처리군과 비교 시 440배 증가하였으며, CNYEE를 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때 IL-6의 분비량이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3A). 특히 100 µg/mL 농도에서는 LPS 단독 처리구와 비교하였을 때 73% 이상의 억제 효과를 보였다. 이는 참도박 에탄올 추출물을 처리한 후 IL-6 분비량을 측정하였을 때 100 µg/mL의 농도에서 80% 이상의 억제 효과를 보인 결과(13)와 유사하다. TNF-α의 경우 농도 의존적으로 분비량이 억제되었는데 LPS를 단독으로 처리하여 $1,584.51 \pm 10$ pg/mL의 분비량을 나타낸 것과 비교하여 100 µg/mL에서는 분비량이 740.63 ± 1.18 pg/mL로 53% 이상의 억제 효과를 보임을 확인하였다(Fig. 3B). CNYEE는 IL-1β 분비량에서 또한 다른 cytokine 분비 감소 결과와 마찬가지로 분비량을 농도 의존적으로 감소시켰다. 특히 50 및 100 µg/mL 농도에서는 50% 이상으로 감소 효과가 크게 나타났다(Fig. 3C). 이는 참모자반 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 pro-inflammatory cytokine의 분비량을 저해한 결과(29)와 유사하다. 따라서 이러한 결과를 종합해볼 때 CNYEE는 pro-inflammatory cytokine인 IL-6, TNF-α, IL-1β 분비 억제를 통해 우수한 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

iNOS, COX-2 및 NF-κB p65 발현 억제 효과

iNOS는 대식세포의 자극 때문에 생성되는 물질로 NO를 합성하는 NOS 효소의 한 종류이다. 세 종류의 NOS에서 neuronal NOS(nNOS)와 endothelial NOS(eNOS)는 세포 내에서 항상 발현이 유지되지만 iNOS는 LPS와 pro-inflammatory cytokine에 의해 발현이 증가한다(30). 이는 세포 내에서 L-arginine을 NO로 전환해 과량의 NO가 생성되어 염증매개물질로서 염증성 cytokine의 발현을 유도하는 등의 염증반응을 일으킨다(31,32). NO와 마찬가지로 중요한 염증매개물질인 PG는 arachidonic acid가 COX라 불리는 PG synthase 효소의 촉매작용을 받아 형성된다. 2가

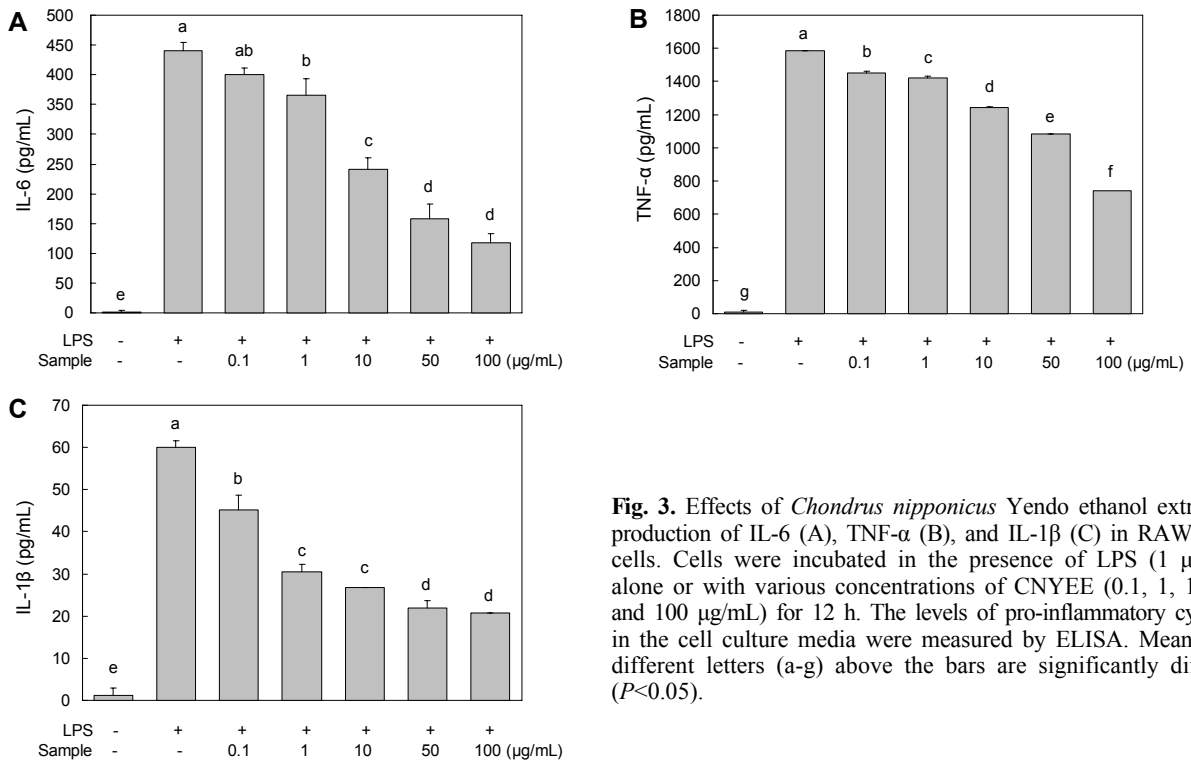


Fig. 3. Effects of *Chondrus nipponicus* Yendo ethanol extract on production of IL-6 (A), TNF- α (B), and IL-1 β (C) in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 μ g/mL) alone or with various concentrations of CNYEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μ g/mL) for 12 h. The levels of pro-inflammatory cytokine in the cell culture media were measured by ELISA. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

지 isoform(COX-1, COX-2)으로 존재하는 COX 중 COX-1은 정상적인 생체기능에 적용되어 인체에 유익한 PGs 형성에 관여하는 효소지만, COX-2는 growth factor, cytokine 등 pro-inflammatory agent에 의해 과대 발현되어 통증과 염증을 유발하는 PGs의 분비에 작용하고 염증뿐 아니라 퇴행성 질환에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(33-35). 이러한 iNOS 및 COX-2는 LPS 자극으로 NF- κ B가 핵으로 이동함에 따라 염증매개 유전자의 프로모터에 결합하여 발현이 유도된다(36). 따라서 이러한 iNOS와 COX-2에 대한 선택적 inhibitor의 개발은 주요한 염증 치료제 개발의 target이 되고 있다. 본 연구에서는 앞서 나타난 NO와 cytokines의 억제 효과가 어떠한 pathway에서 작용하여 나타난 결과인지 알아보고자 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현의 억제 효과를 관찰하였다. RAW 264.7 세포에 CNYEE를 0.1~100 μ g/mL 농도로 처리하고 western blot을 통해 LPS에 의한 iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65 단백질 발현 증가에 대한 억제 효과를 확인하였다(Fig. 4). 그 결과 LPS 자극으로 급격히 증가한 iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65의 발현량이 CNYEE 처리에 의해 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였다. iNOS 발현량은 CNYEE를 100 μ g/mL로 처리하였을 때 LPS 단독 처리구에 비하여 48% 이상의 억제 효과를 나타냈다. 특히 CNYEE는 50 μ g/mL 농도에서 COX-2 및 NF- κ B p65의 발현량을 60% 및 41% 이상으로 억제했다. 이는 참모자반 에탄올 추출물을 0.1~100 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 100 μ g/mL 농도에서 COX-2와 NF- κ B p65의 발현량을 50% 이상 억제한 결과와 유사하다(29). 이러한

결과를 종합해볼 때 CNYEE가 LPS에 의해 유도된 염증반응에서 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제함에 따라 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함으로써 NO와 cytokine의 분비를 효과적으로 저해한 것으로 사료된다.

MAP kinase(JNK, ERK, p38) 발현 억제 효과

MAPK는 세포 성장, 분열, 스트레스나 cytokine에 의한 세포반응의 조절 및 다양한 염증매개인자, NF- κ B의 활성화에 영향을 주는 가장 대표적인 신호분자이다(37). 포유류에서 이러한 MAPK는 JNK, ERK, p38 등 최소한 3가지의 신호전달 경로가 보고되어 있으며 각 효소의 tyrosine과 threonine 잔기의 인산화에 의해 활성이 조절된다. 그중 JNK의 경우 I κ B kinase의 직접적인 인산화를 통해 NF- κ B를 활성화해 염증반응을 일으킨다고 알려졌다. 또한 ERK 및 p38은 iNOS 및 NO 생성경로에서 주요한 역할을 한다(38-40). 이와 더불어 MAPK는 AP-1, activating transcription factor-2, cAMP-responsive element binding protein을 포함한 다양한 전사인자들의 활성화에 관여하는 핵심 신호전달 분자이다(38). 본 연구에서는 CNYEE가 RAW 264.7 세포에서 LPS 유도성 염증매개인자의 유리 억제에 있어 세포내 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해 MAPKs 경로에서 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 관찰하였다. 그 결과 CNYEE는 MAP kinase에 있어 인산화된 3종의 MAPKs의 발현을 모두 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 5). 특히 CNYEE를 100 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 p-p38의 발현량을 73% 이상 억제하는 효과를 나타내었고,

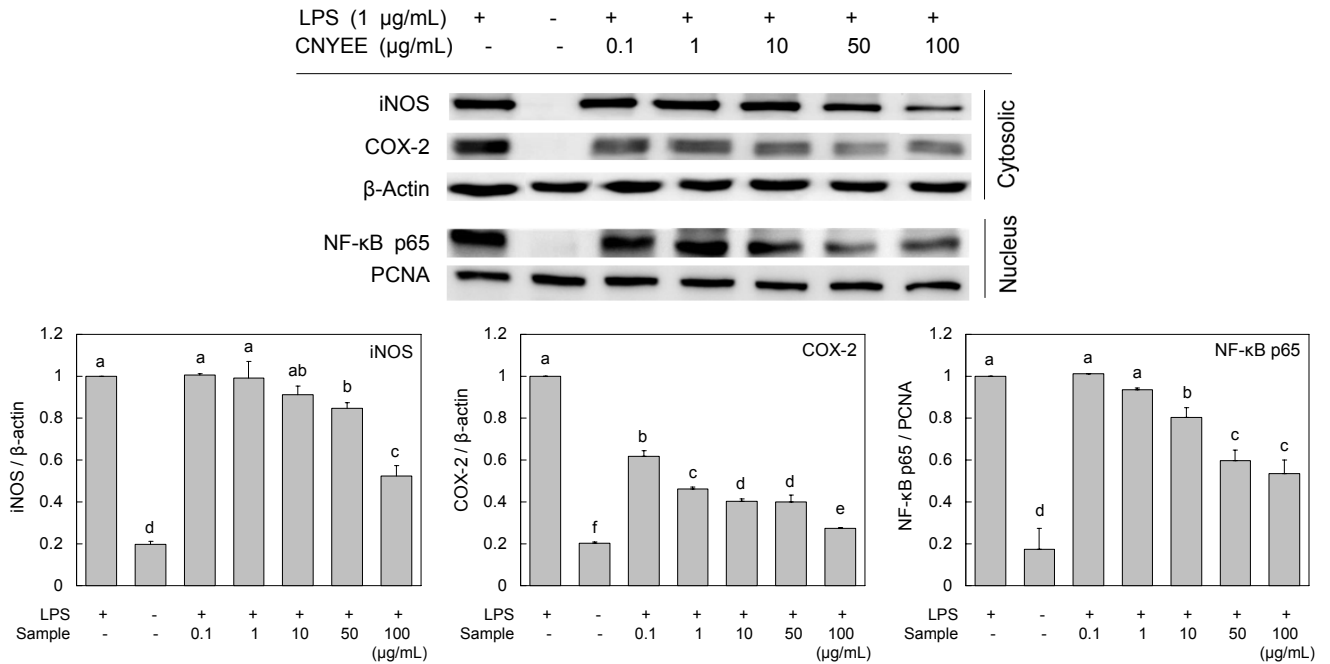


Fig. 4. Effects of *Chondrus nipponicus* Yendo ethanol extract on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF-κB p65 expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells. The levels of iNOS and COX-2 in the cytosolic protein was measured after treatment of the indicated concentrations of CNYEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) and LPS (1 µg/mL) for 18 h. The level of NF-κB p65 in nuclear protein was determined after treatment of CNYEE and LPS for 30 min. The proteins were detected using specific antibodies. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

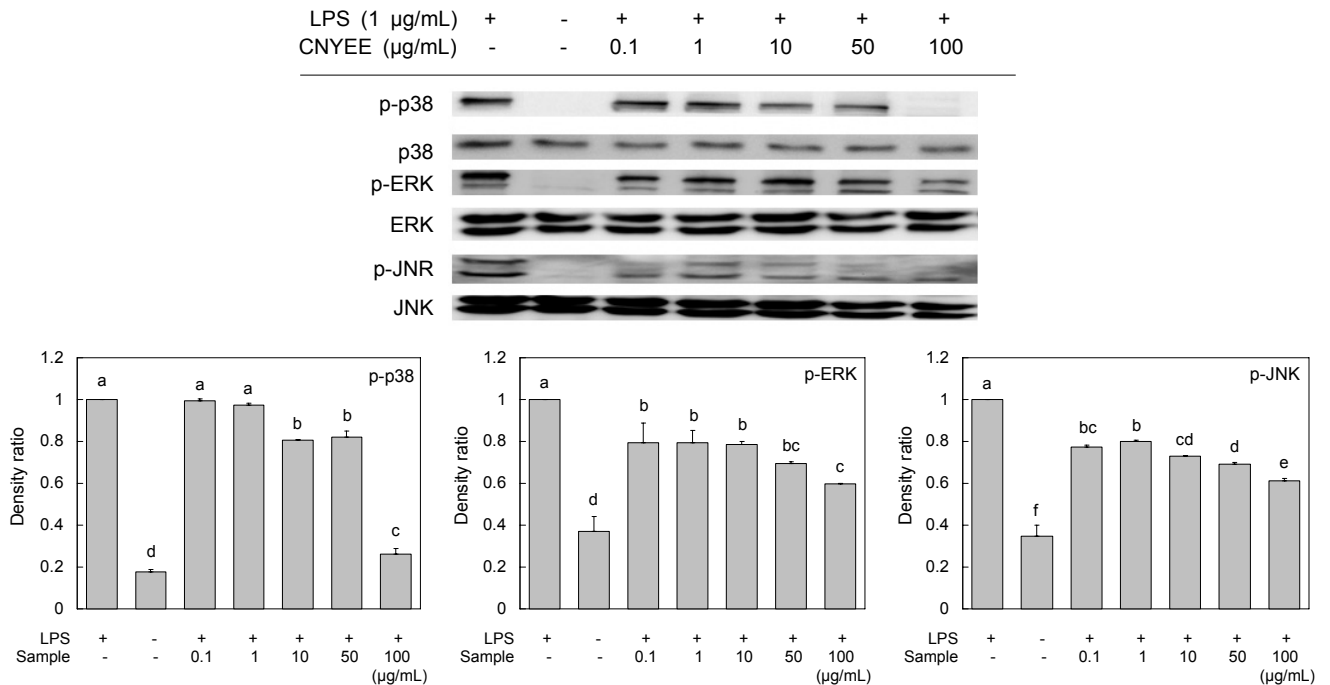


Fig. 5. Effects of *Chondrus nipponicus* Yendo ethanol extract on MAPKs expression in RAW 264.7 cells. The levels of p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK, and JNK in the cytosolic protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of CNYEE (0.1, 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-f) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

p-ERK와 p-JNK의 단백질 발현량 또한 LPS를 단독 처리구에 비해 각각 41% 및 39% 이상의 억제 효과를 보였다. 이상

의 결과를 종합해볼 때 CNYEE는 대식세포에서 NF-κB 및 MAPKs의 활성을 억제함으로써 iNOS, COX-2 및 염증성

cytokine의 발현을 억제하여 염증반응에 있어 뛰어난 항염증 효과가 있는 것을 알 수 있다.

요 약

본 연구에서는 lipopolysaccharide(LPS)로 자극한 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 가락진두발 에탄올 추출물(CNYEE)의 항염증 효과를 알아보기 위하여 nitric oxide(NO)와 pro-inflammatory cytokine의 분비량을 확인하였다. 그 결과 CNYEE 모든 농도에서 LPS만을 처리한 대조군과 비교하였을 때 유의성 있게 NO와 pro-inflammatory cytokine의 분비량을 저해하였으며, 특히 100 µg/mL 농도에서는 IL-6의 분비량을 70% 이상 억제하였고, TNF-α 및 IL-1β의 분비량은 50% 이상의 억제 효과를 나타내었다. CNYEE에 의한 염증매개물질의 분비 감소가 전사인자인 nuclear factor-κB(NF-κB)의 핵 내 전이 pathway를 저해함으로써 나타난 결과인지 확인하기 위하여 iNOS, COX-2 및 NF-κB p65의 단백질 발현량을 관찰한 결과, 비교적 낮은 농도인 50 µg/mL에서 40% 이상의 저해능을 보인 것으로 보아 NO와 cytokine의 분비 억제 효과가 NF-κB pathway를 저해함으로써 나타난 것임을 유추할 수 있었다. 또한 LPS에 의해 증가한 mitogen-activated protein kinases의 인산화를 확인한 결과, CNYEE 처리에 의해 농도 의존적으로 유의성 있게 저해되었다. 이러한 결과를 종합해볼 때 가락진두발 에탄올 추출물은 염증매개물질의 분비를 효과적으로 저해함으로써 추후 천연물로서 염증 치료제의 개발이 가능할 것으로 생각한다.

감사의 글

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

REFERENCES

- Willoughby DA. 1975. Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis* 34: 471-478.
- Miyake K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* 12: 186-192.
- Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC. 2008. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-κB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol* 154: 165-173.
- Dhawan P, Richmond A. 2002. A novel NF-κB-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-κB activity in melanoma cells. *J Biol Chem* 277: 7920-7928.
- Hofseth LJ, Ying L. 2006. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1765: 74-84.
- Jeong DH, Kim KBWR, Kang BK, Jung SA, Kim HJ, Jeong HY, Bark SW, Ahn DH. 2012. Anti-inflammatory activity of the *Undaria pinnatifida* water extract. *J Appl Biol Chem* 55: 221-225.
- Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Ahn NK, Choi YU, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 46: 729-733.
- Lee JH, Kim ND, Choi JS, Kim YJ, Heo MY, Lim SY, Park KY. 1998. Inhibitory effects of the methanolic extract of an edible brown alga, *Ecklonia stolonifera* and its component, phloroglucinol on aflatoxin B₁ mutagenicity *in vitro* (Ames test) and on benzo(a)pyrene or N-methyl N-nitrosourea clastogenicity *in vivo* (mouse micronucleus test). *Nat Prod Sci* 4: 105-114.
- Kim HS, Kim GJ. 1998. Effects of the feeding *Hizikia fusiforme* (Harvey) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 718-723.
- Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrob Chemother* 50: 889-893.
- Bae SJ. 2004. Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Chondria crassicaulis*. *J Life Sci* 14: 411-416.
- Shin JH, Choi DJ, Lim HC, Seo JK, Lee SJ, Choi SY, Sung NJ. 2006. Nutrients and antioxidant activity of red seaweeds. *J Life Sci* 16: 400-408.
- 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.
- 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-κB in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 29: 985-990.
- 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.
- Sheeba MS, Asha VV. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF-α and iNOS expression, which is mediated by NF-κB 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 USA* 76: 4350-4354.
- Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Ahn NK, Choi YU, Bae NY, Park JH, Ahn DH. 2015. Anti-inflammatory effect of *Sargassum coreanum* ethanolic extract through suppression of NF-κB pathway in LPS induced RAW264.7 cells in mice. *Microbiol Biotechnol Lett* 43: 112-119.
- 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.
21. Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1205-1210.
 22. 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.
 23. 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: 823821.
 24. Hyun TK, Ko YJ, Kim EH, Chung IM, Kim JS. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax moribifera* leaf extracts. *Ind Crops Prod* 74: 263-270.
 25. Nathan C, Xie QW. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918.
 26. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. 2002. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J* 368: 121-129.
 27. Chen X, Miao J, Wang H, Zhao F, Hu J, Gao P, Wang Y, Zhang L, Yan M. 2015. The anti-inflammatory activities of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract and its components in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages through inhibition of NF- κ B pathway. *J Ethnopharmacol* 170: 72-80.
 28. 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.
 29. 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* lipopolysaccharide induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells and mice ears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1158-1165.
 30. Kim DH, Hwang EY, Son JH. 2013. Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorius* seed extract in Raw 264.7 cells. *J Life Sci* 23: 55-62.
 31. Miyasaka N, Hirata Y. 1997. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci* 61: 2073-2081.
 32. Simmons ML, Murphy S. 1992. Induction of nitric oxide from glial cells. *J Neurochem* 59: 897-905.
 33. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. 2003. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 33: 155-167.
 34. Needleman P, Isakson PC. 1997. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol* 49: 6-8.
 35. Seybold VS, Jia YP, Abrahams LG. 2003. Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain* 105: 47-55.
 36. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177: 1779-1784.
 37. Robinson MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186.
 38. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
 39. Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin DJ, Han SK, Park SM, Park JH, Park HI, Sung JM, Jang Y, Chung N, Hwang KC, Kim TW. 2006. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 545: 192-199.
 40. Park JS, Lee EJ, Lee JC, Kim WK, Kim HS. 2007. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF- κ B and ERK signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 7: 70-77.