

갯지렁이와 지렁이 추출물의 항염증 및 항산화 효과 비교

김세웅¹ · 삽코타마헤쉬¹ · 이 양¹ · 양 명¹ · 박찬일² · 소윤조^{1*}
¹전북대학교 치의학전문대학원 치과약리학교실, ²경상대학교 해양과학대학

Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Clam Worm Extract in Macrophage RAW264.7 Cells

Se-woong Kim¹, Mahesh Sapkota¹, Liang Li, Ming Yang¹, Chan-il Park² and Yunjo Soh^{*}

¹Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeon-Ju 561-756, Korea

²Institute of Marine Industry, College of Marine Science, Gyeongsang National University, Tongyeong, Gyeongnam 650-160, Korea

Abstract – Earth worm (*Eisenia andrei*) and clam worm (*Perinereis linea*) have been used as anti-bacterial and anti-inflammatory agent. However, it is unclear how they exerted their physiological effects in macrophages. In this experiment, the anti-inflammatory and antioxidant effects of clam worm extract (CWE) and earth worm extract (EWE) in RAW264.7 cells were examined by measuring MDA, catalase, SOD, GSH-Px and inflammatory cytokines (nitric oxide, iNOS, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α). Treatment with CWE significantly increased the activities of catalase, SOD and GSH-Px in RAW264.7 cells and decreased the level of MDA. Interestingly, treatment with CWE induced more activities of SOD than EWE. In addition, CWE decreased NO production, iNOS, COX-2, TNF- α and IL-1 β in RAW264.7. The EWE also decreased NO production and iNOS, but increased COX-2 and IL-1 β suggesting that CWE could be better resources for anti-inflammatory and antioxidant agent than EWE. Taken together, these results indicate that CWE has the potential as a natural antioxidant and a therapeutic for inflammation-related diseases.

Key words – Earth worm, Clam worm, Anti-inflammation, Antioxidant

염증 반응은 감염으로 인한 대식세포의 외부 침입 물질에 대한 방어기전이며, 발진, 발열, 통증과 같은 증상을 수반한다. 대식세포가 활성화되면, 많은 염증성 인자들을 생산하는데, 그 인자들에는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), leukotrienes, nitric oxide(NO) 등이 있다.^{1,2)} 과도한 염증인자의 생산은 류마티스성 관절염, 천식, 호흡기 질환, 폐혈증 등의 질환을 유발하는 중요한 지표가 된다. 대식세포는 대표적인 염증 매개물인 NO 생성에 관여하며 급성 및 만성염증 반응에서 L-arginine으로부터 생성된다.³⁾ NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS)로 자극하면 iNOS(inducible nitric oxide synthase)가 발현되어 NO를 생성하게 된다.^{4,5)} 그러므로 NO의 과량 생성은 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 또한 cyclooxygenase-2(COX-2)는 아라키돈산으로부터 염증매

물질인 PGE2(prostaglandin E2) 생성을 촉매하는 효소로서 iNOS와 마찬가지로 염증반응에 중요한 역할을 한다. 또한 LPS에 의한 대식세포의 활성화 시 IL-1 β 및 TNF- α 와 같은 염증인자 등을 생산하게 된다.^{6,7)} 생체의 산화반응 과정 중에 생성되는 활성산소들은 체내의 항산화효소(Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase)에 의해 제거되나,⁸⁾ 이를 초과한 과량의 활성산소종(Reactive oxygen species; ROS)으로 인한 산화적 스트레스가 항산화물질에 의해 감소된다. 최근 염증에 의한 질병에 활성산소종이 관련되어 있다고 보고 되었으며,⁹⁾ Miesel¹⁰⁾ 등은 매우 독성이 강한 산화제인 superoxide를 포함하는 활성산소종은 염증기간 동안에 조직 손상을 직접 초래할 수 있다고 보고하였다. 따라서 NO의 생성이나 iNOS, COX-2, IL-1 β 및 TNF- α 의 발현 억제와 염증에 의한 활성산소종의 억제는 염증질환을 치료하는데 있어서 중요한 목표가 된다.

전통의학(traditional oriental medicine)에서 지렁이 추출물(earthworm extract)은 심혈관 질병¹¹⁾과 해열제¹²⁾로 광범위하게 사용되어 왔다. 최근 보고에서 지렁이 추출물은 섬유소

*교신저자(E-mail): ysoh@jbnu.ac.kr
(Tel): +82-63-270-4038

용해(fibrinolytic),¹³⁾ 항응혈제활성(anticoagulative activities),¹⁴⁾ 간기능보호활성(hepatoprotective activity)¹⁵⁾ 및 항산화활성(antioxidative activity)¹⁶⁾을 보고하였다. 또한 지렁이 조직에 폴리페놀산(polyphenolic)이 높게 존재하여 항염증, 항산화 효과를 보고하였다.¹⁷⁾ 그러나 지렁이에 대한 항염증, 항산화 관련 실험에 대한 검증은 많지 않으며 체외 실험을 통한 염증억제 및 항산화 효과에 대한 추가 검증이 필요할 것으로 판단한다. 갯지렁이(*Perinereis linea*)는 해양 갯지렁이(marine clamworm)의 한 종류로 동양의학에서 수백 년 전부터 한방의약에 사용되어 왔다. 최근 보고서에서 갯지렁이에서 항균펩타이드(perinerin)¹⁸⁾를 분리하여 그 생리활성을 분석하였다. 또한 갯지렁이에서 자이언트 헤모글로빈(giant hemoglobin)¹⁹⁾과 섬유소 용해 단백질(fibrinolytic protein)²⁰⁾의 존재를 보고하였다. 지렁이와 갯지렁이는 비슷한 종류의 환형동물(annelid)이며 섬유소 용해 단백질의 구조 또한 비슷한 특징을 가진다.²¹⁻²³⁾ 그러나 지렁이 추출물에 대한 연구 조차 많이 진행되지 않았으며 갯지렁이에 대한 항염증, 항산화 연구는 거의 보고된바 없다. 따라서 본 연구에서는 지렁이와 갯지렁이의 추출물을 이용하여 LPS로 유도한 대식세포에서 항염증 관련 인자 NO, iNOS, IL-1 β , TNF- α , COX-2의 억제 효과를 조사하였고, 항산화 관련 인자인 catalase, SOD, glutathione peroxidase(GSH-Px) 및 free malondialdehyde(MDA) 측정을 통한 항산화 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 지렁이는 어병이 낚시(대구)에서 판매하는 붉은줄지렁이(*Eisenia andrei*)를 구입하여 실험에 공시하였고, 갯지렁이는 블루오션파이썬에서 판매하는 두토막눈썩참갯지렁이(*Perinereis linea*)를 구매하여 실험에 공시하였다. 일반지렁이는 전북대학교의 홍용박사가, 갯지렁이는 인하대학교의 홍재상교수가 검증한 후 실험에 사용하였고 각각의 표준품은 전북대학교 치의학 전문대학원 치과약리학교실에 보관하였다.

지렁이와 갯지렁이 추출물 제조 - 지렁이의 분말은 증류수를 이용하여 4-8회 세척을 통해 이물질을 제거 후 deep freezer에 24시간 보관 후 동결건조기(Ilshin Rab Co., Ltd.)를 사용하여 동결건조 하였으며, 동결 건조된 지렁이를 믹서를 이용하여 분말을 제조하였다. 갯지렁이 분말은 해수에서 4-8회 세척을 통해 이물질을 제거 후 지렁이와 같은 방법으로 분말을 제조하였다. 추출물 제조는 제조된 분말가루 3 g을 70% 에탄올 30 ml에 녹인 후 24시간 실온에 방치한 후 상층액을 회수하여 370 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액만을 분리하였다. 분리된 상층액은 다시 deep freezer에서 24시간 보관 후 동결건조기를 이용하여 동결건조를 하

였다. 동결 건조된 추출물은 증류수 5 ml에 녹인 후 4 $^{\circ}$ C에서 2,290 \times g, 5분 동안 원심 분리하여 상층액만을 회수하였다. 회수된 상층액은 0.45 μ m 필터를 이용하여 필터 후 실험에 사용하기 전까지 deep freezer에서 보관하였다.

시약 및 기기 - 배양액에 사용하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지와 heat-inactivated Fetal bovine serum(FBS)는 Gibco BRL(Gaithersburg, MD, USA), Antibiotics(penicillin G와 streptomycin) 용액은 Hyclone (Logan, UT) 제품을 구입해 사용 하였다. 항산화 분석에 사용되는 SOD kit는 trevigen(Gaithersburg, MD, USA), GSH-Px kit는 Oxis International, Inc.(Forster, CA, USA)에서 구입해 사용하였다. 염증억제 관련 분석 시 사용되는 IL-1 β 와 TNF- α 의 ELISA 키트는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Western 분석 시 사용되는 ECL Plus kit는 Amersham Biosciences(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다. 다른 모든 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western 분석에 사용되는 모든 장비는 Bio Rad(Hercules, CA, USA)제품을 사용하였고, ELISA microplate reader는 Biotech(USA), UV-visible spectrophotometer는 Shimadzu(Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다.

대식세포의 세포배양 - 쥐의 대식세포 Raw264.7 세포주는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구매하여 실험에 공시되었다. 대식세포의 세포배양은 세포 배양액 DMEM에 10% FBS와 antibiotics(100 units/ml penicillin G and 100 μ g/ml streptomycin)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$, 95% 습도 조건하에서 배양하였다. 대식세포는 염증을 유발하기 위해 LPS(2 μ g/ml)을 FBS가 없는 배양액에 첨가하여 염증을 유도하였으며, 지렁이와 갯지렁이 추출물은 여러 농도를 첨가한 후 실험에 이용하였다.

세포 생존율 측정 - RAW264.7 cell을 96 well plate에 5 \times 10 3 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후, 지렁이와 갯지렁이를 농도별로 처리하여 후 PBS에서 세척 후 배양액에 100 μ g/ml MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]를 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양하였다. 세포는 다시 PBS로 세척 후 200 μ l DMSO를 첨가해 녹인 후 ELISA microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포의 생존율은 대조구에 대한 백분율로 표시하였다.

지질과산화 측정 - 지질과산화(lipid peroxidation)은 Prasad K 등의 방법²⁵⁾을 사용하여 thiobarbituric acid로 측정하였다. 전체 세포 추출물은 10% (w/v) trichloroacetic acid을 2배로 섞어 침전시킨다. 표준곡선은 malondialdehyde(MDA)의 재료인 malondialdehyde bisdimethylacetal을 사용하여 준비하였다. 12,000 \times g에서 10분 동안 원심분리 후 상층액은 1시간 동안 boiling water에서 0.67% (w/v) thiobarbituric acid

을 동일한 양을 첨가하여 반응시킨다. MDA 측정은 ELISA microplate reader로 532 nm에서 흡광도를 측정하여 MDA의 농도를 측정하였다.

NO 생성량 측정 - NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 지렁이와 갯지렁이 추출물을 전 처리하고 2시간 후 2 µg/ml의 LPS를 처리하여 20시간 배양하였다. 배양액 150 µl에 50 µl의 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine in 2.5% phosphoric acid solution)을 넣어주고 10분간 상온에서 반응 시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NaNO₂의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 계산하였다.

효소측정 - Catalase 활성은 Aebi등의 방법²⁶⁾을 사용하여 측정하였다. 반응은 최종 양이 1 ml이 되게 전체 세포 단백질을 100 µg에 100 mM KH₂PO₄(pH 7.0) 850 µl, 19 mM H₂O₂ 150 µl를 첨가하여 반응을 유도하였다. 4분 동안 10초 간격으로 25°C에서 흡광도(240 nm)를 측정하였다. Catalase의 specific activity는 다음 공식을 사용해 계산되었다: units/mg of protein/min=ΔA240 nm(1 min) × 1000/43.6 × mg protein. GSH-Px 활성도는 50 mM Tris/HCl(pH 7.0)이 함유된 900 µl GSH-Px assay buffer와 1.6 mM GSH, 0.32 mM NADPH를 포함한 50 µl NADPH assay reagent에 0.5 mM EDTA를 cuvette에 첨가하여 4분 동안 5초 간격으로 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성은 SOD assay kit(Oxis Research, Portland, OR USA)를 사용하였다. Boric acid와 diethylenetriaminepenta acetic acid(DTPA)가 들어있는 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol(pH 8.0)액 900 µl, 40 µl의 단백질 시료(0.1~0.5 mg) 및 1-methyl-2-vinylpyridium trifluoromethanesulfonate액 30 µl를 1 ml cuvette에 넣고 섞은 후 1분동안 37°C에 두었다가 DTPA와 ethanol이 들어있는 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo[c]fluorine액 30 µl를 첨가한 후 525 nm에서 흡광도의 변화를 5분간 측정하였다.

Western Blot 분석 - 전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold PBS으로 3회 세척한 후, lysis buffer [20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF), 및 1×protease inhibitor cocktail]를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 16,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. 이후, 동일한 양의 단백질을 8~10% SDS-PAGE로 분리시킨 후, 단백질을 polyvinylidene difluoride(PVDF) 막(Bio-Rad)으로 transfer하였다. 이 막을 항체의 비 특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer(5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각각의 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40 분간 세척한

다음, 2차항체와 반응시켰다. 이어서 ECL Plus kit(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인 하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay 방법을 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

TNF-α와 IL-1β 측정 - 세포 배양액 내의 TNF-α와 IL-1β의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 수행하였다. 대식세포를 1×10⁶ cells/well로 현탁하고, 다양한 농도의 추출물을 전처리 하고 30분 뒤에 LPS(2 µg/ml)로 자극하여 24시간 배양하였다. 세포 상층액을 수집하여 TNF-α, IL-1β를 ELISA 방법으로 정량 하였다.

통계처리 - 모든 실험 결과는 3회 이상 실시하였으며 그 평균값을 기초로 Mean±S.D.로 나타내었다. 실험에서 얻은 실험군 간의 결과는 student's t-test로 분석하였으며 대조군과 비교하여 P-value가 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

지렁이와 갯지렁이 추출물에 대한 세포 독성 - 지렁이와 갯지렁이 추출물의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT 분석 방법을 사용하여 생존율을 측정하였다. 각 처리 농도 2.5, 5 그리고 10 µg/ml에서 대조군과 비교하여 세포 내 독성은 없는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 지렁이와 갯지렁이 추출물은 세포 내 독성이 없는 것으로 판단되며, Fu등의 보고²⁷⁾에서 지렁이의 경우 MG-63 세포에 지렁이 추출물을 처리 시 50 µg/ml 농도에서 세포 내 독성이 없었지만, 오히려 500 µg/ml에서 세포의 성장이 촉진되는 결과를 나타내었다. 또한 갯지렁이의 경우 지렁이와 동일한 농도(2.5~10 µg/ml)에서 세포 내 독성이 나타나지 않았다. 따라서 본 실험에서 지렁이와 갯지렁이의 적정 농도를 2.5, 5 그리고 10 µg/ml로

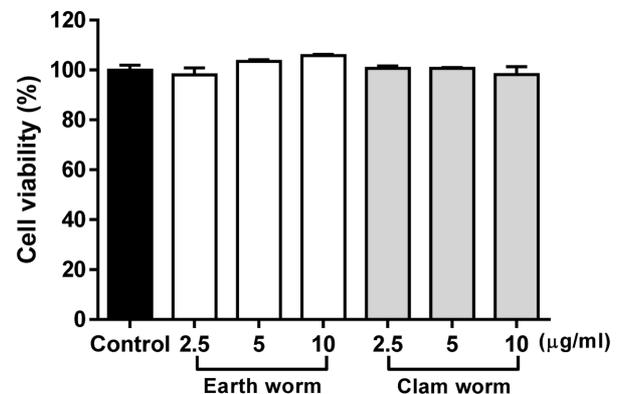


Fig. 1. Effects of earth worm and clam worm extract on RAW264.7 cell viability. The cells were treated with 2.5, 5 and 10 µg/ml of extracts for 24 h and cell viabilities were measured by MTT assay.

판단하여 실험을 진행하였다.

지렁이와 갯지렁이 추출물에 대한 질산과산화 억제 효과 - 질산과산화가 세포 내 손상 기전을 잘 나타내 주기 때문에 MDA 측정방법을 사용하여 질산과산화 억제 효과를 측정하였다. LPS 처리 후 지렁이와 갯지렁이 추출물의 억제 효과를 알아보기 위해 각각 2.5-10 µg/ml 농도를 처리하여 질산과산화 억제 효과를 측정하였다(Fig. 2). LPS 처리군(130.7±0.86)과 비교해 지렁이(12.9±0.86에서 11.3±0.86)와 갯지렁이(124.9±1.17에서 117.2±0.65)에서 농도 의존적으로 유의적 감소를 나타내었다($P<0.05$). 특히 지렁이와 갯지렁이 10 µg/ml 농도에서 각각 높은 억제 효과를 나타내었다. 질산과산화는 외부의 강력한 자극이나 상처에 의해 발생되며, 특히 LPS의 처리에 의한 질산과산화의 증가는 세

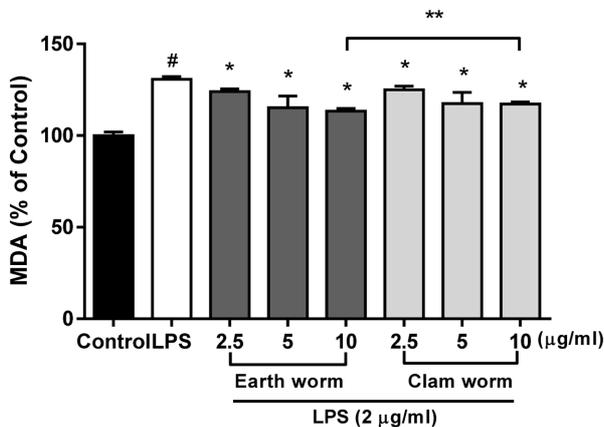


Fig. 2. Effects of earth worm and clam worm extracts on MDA in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Cells were pre-incubated with or without indicated concentrations of extracts for 2 h, and then treated with LPS (2 µg/ml) for 20 h. # $P<0.05$ as compared with the untreated group. * $P<0.05$ as compared with the LPS treatment group. ** $P<0.05$ as compared with the earth worm (10 µg/ml) and clam worm (10 µg/ml) treatment group.

포 손상과 항산화 물질의 감소를 초래한다.²⁸⁾ 따라서 지렁이와 갯지렁이 추출물은 LPS에 의한 질산과산화의 생성을 억제할 수 있다고 판단된다.

지렁이와 갯지렁이 추출물에 대한 항산화 효소 활성효과 - 항산화 효소 활성 정도를 측정하기 위해 LPS처리 후 지렁이와 갯지렁이 추출물을 첨가하여 catalase, SOD 및 GSH-Px를 측정하였다(Table I). Catalase 활성은 LPS 처리구(47.04±0.92 units/mg)가 대조구(43.0±1.9 units/mg)에 비해 유의적으로 증가하였지만($P<0.05$), 지렁이 추출물은 LPS 처리구와 비교해 5와 10 µg/ml(58.2±6.4, 71.2±3.3 units/mg) 농도에서 각각 유의적으로 높은 활성도를 나타내었고($P<0.05$), 갯지렁이 추출물도 5와 10 µg/ml(72.7±3.0, 77.6±4.8 units/mg) 농도에서 유의적으로 높은 활성도를 나타내었다($P<0.05$).

SOD 활성은 LPS 처리구(7.76±0.31 units/mg)가 대조구(6.01±0.28 units/mg)에 비해 유의적으로 증가하였지만($P<0.05$), 지렁이 추출물에서 LPS 처리구와 비교해 5와 10 µg/ml(9.51±0.07, 9.64±0.20 units/mg) 농도에서 각각 유의적으로 더 높은 활성도를 나타내었고($P<0.05$), 갯지렁이 추출물 또한 LPS 처리구와 비교해 2.5, 5와 10 µg/ml(9.96±0.23, 11.05±0.23, 13.19±0.99 units/mg)농도에서 각각 유의적으로 더 높은 활성도를 나타내었다($P<0.05$). 특히 갯지렁이 추출물(10 µg/ml)은 지렁이 추출물(10 µg/ml) 비교해 유의적으로 높은 활성도를 나타내었다($P<0.05$). 또한 GSH-Px 활성은 대조구(32.82±0.76 mU/mg)와 LPS 처리구간(33.94±0.30 mU/mg)에 유의적인 차이가 없었으나, 지렁이 추출물은 2.5, 5 그리고 10 µg/ml(37.78±0.30, 39.79±0.35, 41.49±0.24 mU/mg) 농도에서 LPS 처리구와 비교해 유의적으로 높은 활성도를 나타내었다($P<0.05$). 갯지렁이도 5, 10 µg/ml(37.10±0.44, 41.04±0.27 mU/mg) 농도에서 LPS 처리구와 비교해 높은 활성도를 나타내었다. 따라서 이 결과는 MDA 억제 효과는 산화물질의 억제효과를 나타내며 반대로 항산화 물질인 catalase, SOD, GSH-Px의 증가는 지렁이와 갯지렁이 추출

Table I. Effects of earth worm and clam worm on antioxidative enzyme activities in LPS-stimulated RAW264.7 cells

	LPS (2 µg/ml)							
	Control	LPS (2 µg/ml)	Earth worm extract (µg/ml)			Clam worm extract (µg/ml)		
			2.5	5	10	2.5	5	10
Catalase (units/mg protein/min)	43.0±1.9	47.0±0.9 [#]	46.9±0.3	58.2±6.4 [*]	71.2±3.3 [*]	45.6±5.9	72.7±3.0 [*]	77.6±4.8 [*]
SOD (units/mg protein/min)	6.0±0.3	7.7±0.3 [#]	8.5±0.1	9.5±0.1 [*]	9.64±0.2 [*]	10.0±0.2 [*]	11.1±0.2 [*]	13.2±1.0 ^{**}
GSH-px (mU/ml protein)	32.8±0.8	33.9±0.3	37.8±0.3 [*]	39.8±0.4 [*]	41.5±0.2 [*]	33.8±0.6	37.1±0.4 [*]	41.0±0.3 [*]

Cells were pre-incubated with or without indicated concentrations of earth worm or clam worm extract for 2 h, and then treated with LPS (2 µg/ml) for 20 h. The activities of catalase, SOD (superoxide dismutase), and GSH-Px (glutathione peroxidase) were measured as described in the Materials and Methods. Each value represents as mean±S.E.M.

[#] $P<0.05$ as compared with the untreated group.

^{*} $P<0.05$ as compared with the LPS treatment group.

^{**} $P<0.05$ as compared with the earth worm (10 µg/ml) and clam worm (10 µg/ml) treatment group.

물의 항산화 활성을 나타낸다는 것을 반증한다. 특히 MDA 억제 효능에서 지렁이가 갯지렁이 추출물과 비교해 높은 효율을 나타내었지만 SOD 활성에서는 반대로 갯지렁이 추출물이 더 높은 효율을 나타냈다. 그러므로 LPS에 의한 산화 스트레스에 대한 갯지렁이 추출물이 지렁이 추출물과 동일한 효능을 가지고 있다고 판단되며 강력한 항산화제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

지렁이와 갯지렁이의 추출물이 LPS에 유도된 NO생성과 iNOS 단백질 발현 억제에 미치는 효과 - iNOS의 증가에 의한 NO의 과도한 생성과 COX-2의 증가는 염증반응의 특징이다. 따라서 지렁이와 갯지렁이 추출물이 LPS에 의해 유도된 COX-2, iNOS와 NO의 발현에 미치는 영향을 알아 보았다. LPS에 의한 유도된 iNOS의 결과 LPS 처리구는 대조구(Fig. 3A, 3B)에 비해 8배 증가하였지만 지렁이와 갯지렁이 추출물 처리구는 각각 4배 및 8배가 유의적으로 감소되었다($P<0.05$). 또한 갯지렁이는 지렁이 추출물과 비교해 유의적으로 3배 더 감소되는 효과를 나타내었다($P<0.05$). 그러나 COX-2의 경우 LPS 처리구에 비해 갯지렁이 추출물은 유의적으로 2배가 감소되었지만($P<0.05$), 지렁이 추출물(Fig. 3A, 3C)은 감소하지 않고 오히려 더 증가하였다. NO

생산 결과(Fig. 4)에서 LPS 처리구와 비교해 지렁이와 갯지렁이 각 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의적으로 감소하였지만($P<0.05$), 갯지렁이 추출물(426.1 \pm 1.91)과 비교해 지렁이 추출물(384.1 \pm 5.73)이 NO 생산을 유의적으로 더 많은 감소를 나타내었다($P<0.05$). 염증반응에 의한 iNOS, NO, 및 COX-2의 증가는 만성 염증질환을 야기하며²⁹⁾ 염증인자의 억제는 염증관련 질병 치료에 중요하게 인식되고 있다. Balamurugan M 등¹⁷⁾의 보고에서 지렁이 추출물이 항염증제인 Indomethacin과 비슷한 효과를 나타낸다고 보고하였지만 어떤 경로를 통해서 염증을 억제하는지 보고되지 않았다. 본 실험결과 지렁이는 iNOS와 NO에서만 억제 효과가 나타났고 COX-2의 경우 LPS 처리구에 비해 오히려 더 증가되었다. COX-2의 염증대사 경로는 COX-2의 증가에 따라 prostaglandin E₂의 합성이 유도되며 최종적으로 염증반응이 일어나게 되기 때문에³⁰⁾ 지렁이 추출물은 proinflammatory cytokine의 특징도 나타낸다고 사료된다. 따라서 지렁이는 iNOS와 NO의 억제를 통해서 염증반응을 억제 한다고 판단된다. 그러나 갯지렁이 추출물은 iNOS와 COX-2 둘 다 유의미하게 억제하여 NO와 COX-2를 통한 염증반응을 각각 저해하는 결과를 보였다. 이 결과는 갯지렁이 추출물의 항

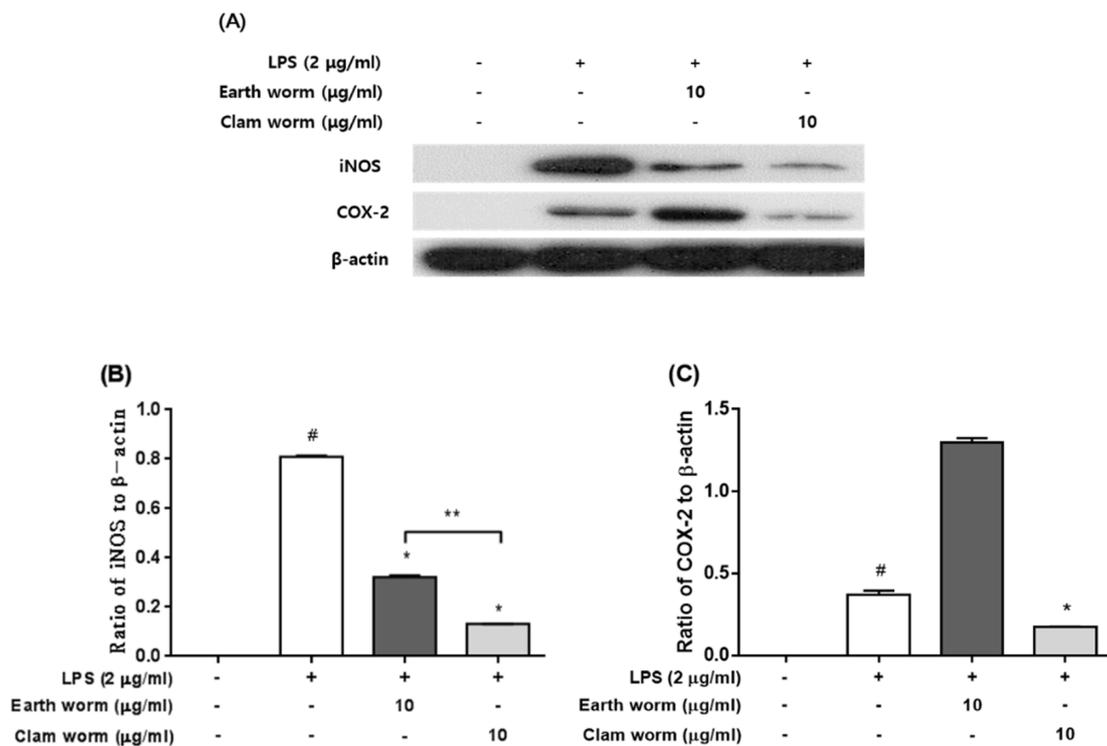


Fig. 3. Effects of earth worm and clam worm extracts on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Expression of iNOS (B), COX-2 (C) and β -actin was detected by immunoblot analysis with specific antibodies (A). Cells were preincubated with or without indicated concentrations of extract for 2 h, and treated with LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) for 20 h.

$P<0.05$ as compared with the untreated group.

* $P<0.05$ as compared with the LPS treatment group.

** $P<0.05$ as compared with the earth worm (10 $\mu\text{g/ml}$) and clam worm (10 $\mu\text{g/ml}$) treatment group.

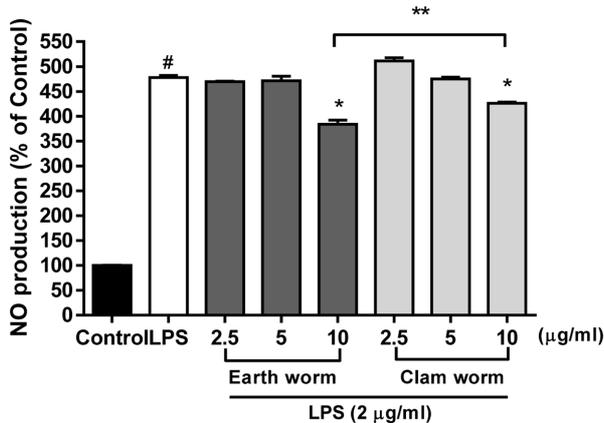


Fig. 4. Effects of earth worm and clam worm on nitrite production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with 2.5, 5, and 10 µg earth worm and clam worm for 30 min before treatment with LPS (2 µg/ml) for 24 h. The supernatants were taken and NO was measured using a Griess reaction assay kit.

#*P*<0.05 as compared with the untreated group.

**P*<0.05 as compared with the LPS treatment group.

***P*<0.05 as compared with the earth worm (10 µg/ml) and clam worm (10 µg/ml) treatment group.

염증 효능을 처음으로 나타낸 결과이며 지렁이와 비교해 더 높은 항염증 효능을 나타내어 갯지렁이의 항염증 제제로의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

지렁이와 갯지렁이의 추출물이 LPS에 의해 유도된 IL-1α와 TNF-α의 억제에 미치는 효과 - IL-1β와 TNF-α는 염증반응에 의해 생산된다. 따라서 염증억제 정도를 측정하기 위해 LPS처리 후 지렁이와 갯지렁이 추출물을 첨가하여 IL-

1β와 TNF-α를 측정하였다. IL-1β의 결과(Fig. 5A)에서 갯지렁이 추출물은 LPS 처리구(125.4±5.0)에 비해 5, 10 µg/ml(97.11±3.3, 84.89±7.8) 농도에서 유의적으로 높은 억제 효과를 나타내었지만(*P*<0.05), 지렁이 추출물은 LPS 처리구와 비교해 오히려 더 증가하였다. TNF-α의 결과(Fig. 5B)에서 LPS 처리구(60.46±0.3)와 비교해 지렁이 추출물은 10 µg/ml(51.81±0.4)에서 유의적으로 높은 억제효과를 나타내었다(*P*<0.05). 또한 갯지렁이 추출물도 2.5, 5, 10 µg/ml (51.81±0.35, 52.71±0.55, 45.26±0.5) 농도에서 유의적으로 높은 억제효과를 나타내었다(*P*<0.05). 따라서 지렁이 추출물의 염증억제는 단지 TNF-α 억제를 통해만 염증억제를 하였으나, 갯지렁이 추출물은 IL-1β와 TNF-α 둘 다 억제하여 지렁이와 비교해 더 높은 염증억제 효능이 있다고 판단된다. 이는 지렁이가 LPS 자극에 염증, 유사분열 촉진 및 세포보호 기능이 있는 COX-2 활성을 통해 반응한 반면 갯지렁이는 LPS에 대한 자극을 억제하기 위해 iNOS, COX-2 등의 활성을 억제하는 반응을 통해 외부자극을 대응한 것으로 여겨진다. 지렁이 추출물의 염증억제 효능은 많은 연구를 통해 증명되었다.^{17,31} 하지만 갯지렁이 추출물의 염증억제에 대한 보고는 거의 없는 실정이며, 본 실험 결과는 갯지렁이 추출물이 지렁이 추출물보다 염증억제 효능이 더 높음을 보였다.

결론

이상의 연구결과를 통하여 지렁이 추출물은 지질과산화 억제를 통해 항산화 물질인 Catalase, SOD, 및 GSH-px를 증가시켜 항산화제로서 가능성을 나타내었고, iNOS의 억제를 통한 NO 생산을 감소시키고 항염증 대사 물질인 TNF-α

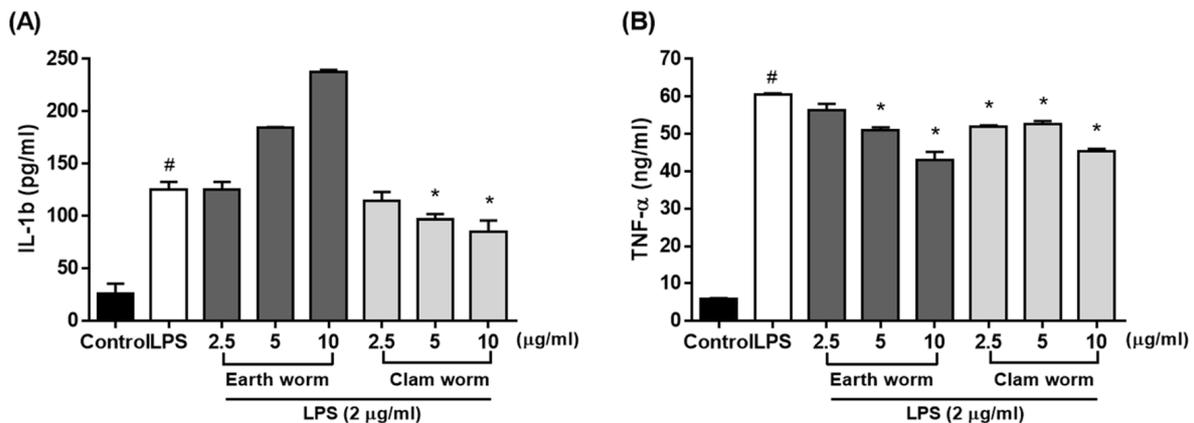


Fig. 5. Effects of earth worm and clam worm extracts on IL-1β (A) and TNF-α (B) release in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cells were pretreated with 2.5, 5 and 10 µg/ml of extracts for 30 min and then stimulated with 2 µg/ml of LPS for 8 h (TNF-α) and 24 h (IL-1β). The levels of secreted cytokines were analyzed by ELISA according to the manufacturer's instructions.

#*P*<0.05 as compared with the untreated group.

**P*<0.05 as compared with the LPS treatment group.

***P*<0.05 as compared with the earth worm (10 µg/ml) and clam worm (10 µg/ml) treatment group.

의 억제를 통한 항염증 제제로서의 가능성을 나타내었지만 IL-1 β 와 COX-2를 억제하지 못하였다. 갯지렁이 추출물도 지질과산화 억제와 항산화 관련 효소를 증가시켰는데 지렁이와는 달리 갯지렁이 추출물은 iNOS, NO 뿐 아니라 COX-2, 및 IL-1 β 도 억제하여 지렁이 추출물에 비해 더 높은 항염증 효능을 나타내었다. 이 결과는 갯지렁이 추출물이 높은 염증억제 효능과 항산화 효과를 나타내어 염증과 관련된 질환 치료에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

사 사

본 연구는 한국해양수산부의 “갯지렁이를 활용한 사료첨가제용 항균펩타이드 개발 (20150284)”라는 수산실용화기술개발사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.
- Moncada, S. (1999) Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J. R. Soc. Med.* **92**: 164-169.
- Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**: 13725-13728.
- Kwqamata, H., Ochiai, H., Mantani, N. and Terasawa, K. (2000) Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am. J. Chin. Med.* **28**: 217-226.
- Chiou, W. F., Chou, C. J. and Chen, C. F. (2001) Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW264.7 macrophages. *Life Sci.* **69**: 625-635.
- Horwood, N. J., Page, T. H., McDaid, J. P., Palmer, C. D., Campbell, J., Mahon, T., Brennan, F. M., Webster, D. and Foxwell, B. M. (2006) Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J. Immunol.* **176**: 635-641.
- Hirohashi, N. and Morrison, D. C. (1996) Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect. Immun.* **64**: 1011-1015.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**: 1-85.
- Lee, S. J., Bai, S. K., Lee, K. S., Namkoong, S., Na, H. J., Ha, K. S., Han, J. A., Yim, S. V., Chang, K., Kwon, Y. G., Lee, S. K. and Kim, Y. M. (2003) Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I κ B kinase-dependent NF- κ B activation. *Mol. Cells* **16**: 97-105.
- Miesel, R., Murphy, M. P. and Kroeger, H. (1996) Enhanced mitochondrial radical production in patients with rheumatoid arthritis correlates with elevated levels of tumor necrosis factor alpha in plasma. *Free Radical Res.* **25**: 161-169.
- Hori, M., Kondon, K., Yoshida, T., Konishi, E. and Minami, S. (1974) Studies of antipyretic components in the Japanese earthworm. *Biochem. Pharmacol.* **23**: 1582-1590.
- Liu, C. H., Lin, Y. W., Tang, N. Y., Liu, H. J., Huang, C. Y. and Hsieh, C. L. (2013) Effect of oral administration of *Pheretima aspergillum* (earthworm) in rats with cerebral infarction induced by middle-cerebral artery occlusion. *Afr. J. Tradit. Complem. Altern. Med.* **10**: 66-82.
- Hrženjak, T., Popović, M., Božić, T., Grdiša, M., Kobrehel, D. and Tiška-Rudman, L. (1998) Fibrinolytic and anticoagulative activities from the earthworm *Eisenia foetida*. *Comp. Biochem. Physiol.* **119B**: 825-832.
- Mihara, H., Maruyama, M. and Sumi, H. (1992) Novel thrombolytic therapy discovered from traditional oriental medicine using the earthworm. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **23 suppl 2**: 131-140.
- Balamurugan, M., Parthasarathi, K., Ranganathan, L. S. and Cooper, E. L. (2008) Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **9B**: 141-147.
- Grdiša, M., Popović, M. and Hrženjak, T. (2001) Glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm *Eisenia foetida* exerts some antioxidative activity. *Comp. Biochem. Physiol.* **128A**: 821-825.
- Balamurugan, M., Parthasarathi K., Cooper, E. L. and Ranganathan, L. S. (2007) Earthworm paste (*Lampito mauritii*, Kinberg) alters inflammatory, oxidative, haematological and serum biochemical indices of inflamed rat. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **11**: 77-90.
- Pan, W., Liu, X., Ge, F., Han, J. and Zheng, T. (2004) Perinerin, a novel antimicrobial peptide purified from the clamworm *Perinereis aibuhitensis* Grube and its partial characterization. *J. Biochem.* **135**: 297-304.
- Tsuneshige, A., Imai, K., Hori, H., Tyuma, I. and Gotoh, T. (1989) Spectrophotometric, electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies on the hemoglobin from the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis* (Grube): Comparative physiology of hemoglobin. *J. Biochem.* **106**: 406-417.
- Tan, R., Xia, Z., Wang, S., Chen, Y. and Zhang, W. (2001) Purification of fibrinolytic enzyme from *Perinereis aibuhitensis*. *Chin. Trad. Herb. Drugs* **31**: 673-674.
- Cooper, E. L. (2004) Complementary and Alternative Medicine, when rigorous, can be Science. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **1**: 1-4.
- Hu, Y., Meng, X. L., Xu, J. P., Lu, W. and Wang, J. (2005) Cloning and expression of earthworm fibrinolytic enzyme PM246 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **43**: 18-25.
- Ge, T., Sun, Z. J., Fu, S. H. and Liang, G. D. (2005) Cloning of thrombolytic enzyme (lumbrokinase) from earthworm and

- its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **42**: 20-28.
24. Wang, F., Wang, C., Li, M., Zhang, J. P., Gui, L. L., An, X. M. and Chang, W. R. (2005) Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component B: A novel, glycosylated two-chained trypsin. *J. Mol. Biol.* **348**: 671-685.
25. Prasad, K., Mantha, S. V., Muir, A. D. and Westcott, N. D. (2000) Protective effect of secoisolariciresinol diglucoside against streptozotocin-induced diabetes and its mechanism. *Mol. Cell Biochem.* **206**: 141-149.
26. Aebi, H. (1984) Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121-126.
27. Fu, Y. T., Chen, K. Y., Chen, Y. S. and Yao, C. H. (2014) Earthworm (*Pheretima aspergillum*) extract stimulates osteoblast activity and inhibits osteoclast differentiation. *BMC Complement Altern. Med.* **14**: 440.
28. Wang, L., Ming, L. X., Jie, L., Wang, Y., Jian, H. H., and Wang, M. H. (2015) *Sonchus asper* extract inhibits LPS-induced oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in RAW264.7 macrophages. *Nutr. Res. Pract.* **9**: 579-585.
29. Franzotti, E. M., Santos, C. V., Rodrigues, H. M., Mourao, R. H., Andrade, M. R. and Antonioli, A. R. (2000) Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *J Ethnopharmacol.* **72**: 273-727.
30. Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* **231**: 232-235.
31. Joo, S. S., Won, T. J., Kim, J. S., Yoo, Y. M., Tak, E. S., Park, S. Y., Park, H. Y., Hwang, K. W., Park, S.,C. and Lee, D. I. (2009) Inhibition of coagulation activation and inflammation by a novel Factor Xa inhibitor synthesized from the earthworm *Eisenia andrei*. *Biol. Pharm. Bull.* **32**: 253-258.
- (2016. 4. 4 접수; 2016. 4. 19 심사; 2016. 4. 20 게재확정)