

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포와 마우스 귀 조직에 대한 주름까막살 에탄올 추출물의 항염증 효과

배난영¹ · 김민지¹ · 김꽃봉우리² · 박선희¹ · 장미란³ · 안동현¹

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³식품의약품안전처 건강기능식품정책과

Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract from *Grateloupia crispata* on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells and Mice Ears

Nan-Young Bae¹, Min-Ji Kim¹, Koth-Bong Woo-Ri Kim², 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 effects of ethanol extract from *Grateloupia crispata* (GCEE) were investigated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophages. Anti-inflammatory effects were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, and immunohistochemistry. There was no cytotoxic effect on proliferation of macrophages treated with GCEE compared to the control. GCEE significantly inhibited production of pro-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α , and IL-1 β] as well as nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. In addition, GCEE suppressed expression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and nuclear factor- κ B in a dose-dependent manner. GCEE significantly reduced activation of mitogen-activated protein kinases. In the *in vivo* test, evaluation of anti-inflammatory activity of GCEE was performed using croton oil-induced ear edema in ICR mice. Oral administration of 10 mg/kg to 250 mg/kg of GCEE significantly reduced ear edema in a dose-dependent manner compared to croton oil-induced mice. Moreover, GCEE reduced ear thickness and the number of mast cells compared to croton oil-induced mice in the histological analysis. These data suggest that GCEE could be used as a potential source for anti-inflammatory agents.

Key words: *Grateloupia crispata*, anti-inflammatory activity, pro-inflammatory cytokines, NF- κ B, MAPKs

서 론

외부자극에 대응하기 위해 생체에서 일어나는 정상적인 방어 기작인 염증반응은 화학적이나 물리적인 조직 손상과 병원체의 감염 등으로부터 인체를 보호하기 위해 일어난다. 이는 암이나 신경변성질환, 심혈관질환, 관절염 등의 많은 만성질환에서 근본적인 병태생리학적 기전으로 알려져 있다(1). 염증반응에는 다양한 면역세포가 관여하는데 그중 대식세포는 혈액 내 존재하며 분화된 형태로 인체의 모든 조직 내에 분포하고 있다. 대식세포는 외부의 이상 자극에 반응하

여 염증을 유도하고 반응을 촉진하는 데 중요한 역할을 한다. 대표적으로 염증 유발물질로 알려진 그람음성균의 외막 성분인 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 전염증성 매개물질들의 분비를 촉진하고 세포 내 염증반응의 신호전달 경로 또한 다양한 연구를 통해 알려져 있다(2). LPS에 의해 촉진된 염증반응은 interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 IL-1 β 와 같은 전염증성 매개물질 및 nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE2) 등의 염증 매개물질을 분비시킨다(3,4). 신호전달 경로에서 nuclear factor kappa B(NF- κ B)와 extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2), c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK), p38 kinases(p38)와 같은 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)에 의해 전염증성 매개물질인 사이토카인의 분비가 촉진된다(5). NF- κ B는 활성화되면 결합해 있던 inhibitor kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)가 분해되면서 세포질에서 핵 내로

Received 16 June 2016; Accepted 29 July 2016

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

이동해 사이토카인 발현을 촉진하는 전사인자로서 작용한다(6,7). 이러한 염증반응은 일차적인 방어 작용으로 인체에 중요한 기작이지만 과도하게 발현된 염증반응은 치매나 암, 비만, 대사성 증후군, 자가 면역질환과 같은 만성질환의 원인이 된다(8). 따라서 염증반응을 억제하는 물질은 만성질환을 예방하거나 억제하기 위하여 사용되기도 하는데 현재 사용하고 있는 항염증제 대부분은 장기복용 시 신장 기능이 저하되고 혈압이 상승하는 등의 부작용뿐 아니라 심근경색 및 혈전 형성 등의 순환계 질환도 유발할 수 있다고 보고되고 있다(9). 이에 따라 안전성과 효능이 우수한 항염증제의 개발에 관한 연구가 수행되고 있으며 천연물을 이용한 항염증제 개발에 관한 관심이 높아지고 있다(10,11).

한편 해조류는 일상생활에서 섭취 가능한 천연물로 생리활성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다(12,13). 주름까막살은 지누아리과 홍조류로 한국의 남해안 및 제주도 연안에 주로 서식하며 적갈색의 연골질로 띠 모양에 두 갈래로 가지를 내고 가장자리에 작은 가지를 내는 특징이 있다(14). 다른 홍조류의 생리활성에 관한 연구(15-17)에 비해 주름까막살에 관한 생리활성 연구는 전혀 없는 실정이다. 본 연구는 주름까막살 에탄올 추출물이 LPS로 자극한 대식세포에서 NF-κB와 MAPKs pathway의 전사 활성 저해를 통해 나타내는 항염증 효과를 연구하고 마우스모델에서의 항염증 효과를 관찰함으로써 주름까막살 에탄올 추출물을 천연염증 치료제로서 개발의 발판을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

연화리에서 2014년도에 채취한 주름까막살은 담수로 여러 차례 깨끗하게 수세한 후 자연건조 하였다. 그 후 동결건조하여 분말화하였으며 진공 포장상태로 -20°C에서 저장하며 실험에 사용하였다.

주름까막살 에탄올 추출물 제조

10배량의 95% 에탄올을 분말 상태의 주름까막살에 가하여 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용해 24시간 추출하였다. 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)로 추출물로부터 상층액을 4°C, 1,977×g에서 10분간 원심분리 하였다. 남은 잔사는 같은 방법을 이용해 2회 반복하여 추출하였고 상층액은 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

세포배양

한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 cell line으로 murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포(KCLB 40071)를 분양받아 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle 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.

실험동물

마우스 귀 조직 관찰 실험에서 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스를 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며 마우스는 온도 20±2°C, 습도 50±10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 부경대학교 동물실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 수행하였다(2015-04).

세포독성 측정

Park 등(18)의 MTT assay 방법을 약간 변형하여 시료의 세포독성을 평가하였다. RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cells/mL의 농도로 96-well plate에 분주해 20시간 전 배양한 후 주름까막살 에탄올 추출물(GCEE)을 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 다음 최종 농도가 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL가 되게 첨가하고 22시간 전 배양하였다. 5 mg/mL MTT(thiazol blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하고 2시간 재배양하였다. 배양 후 4°C, 879×g에서 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 흡광도를 측정하였다. 세포 증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

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

Nitric oxide 분비량 측정

Griess 반응(19)을 이용하여 배양액 내의 nitrite 농도를 측정하였다. RAW 264.7 cell을 2.5×10⁵ cells/mL로 조절해 24-well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 그 후 GCEE를 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL 처리하고 1 µg/mL의 LPS로 자극하여 24시간 전 배양하였다. 배양 상층액은 4°C, 879×g에서 10분간 원심분리 하여 정량 실험에 사용하였다. Griess 시약(1% sulfanilamide+0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)과 배양 상층액은 1:1로 상온에서 10분간 반응시켜 microplate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂)의 농도별 표준곡선(R²=0.9998)과 비교하여 산출하였다.

Pro-inflammatory cytokines 분비량 측정

RAW 264.7 cell의 세포배양액 내의 TNF-α, IL-6 및

IL-1 β cytokine의 분비량을 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)을 이용해 측정하였다. RAW 264.7 cell을 2.5×10^5 cells/mL로 조절하여 24 well plate에 접종하고 18시간 전 배양하였다. 그 후 0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL 농도별 GCEE와 1 μ g/mL의 LPS를 처리하고 12시간의 본 배양을 거쳐 원심분리를 통해 세포배양 상층액을 얻었다. ELISA는 microplate에 anti-mouse TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 capture antibody를 coating buffer에 희석 후 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating 시켰다. 이후 0.05% Tween 20이 포함된 phosphate buffered saline(PBST)으로 세척한 후 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 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 분주하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1 β 의 경우 biotinylated anti-mouse IL-1 β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 반응 후 이를 다시 PBST로 세척하고 o-phenylenediamine dihydrochloride(OPD) 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량 측정

GCEE가 세포질 내 생성되는 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2) 및 NF- κ B의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS로 세척한 후, Sheeba와 Asha(20)의 방법에 따라 cytosol lysis buffer[50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES, pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40]를 이용하였으며, NF- κ B p65의 경우 nucleus lysis buffer(10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol)를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후, 7,908 \times g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질을 정량하였으며 30 μ L의 lysate를 Laemmli(21)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등(22)의 방법을 참고하여 polyvinylidene difluoride(PVDF) 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 및 NF-

κ B p65의 발현량을 검토했기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 씻었다. 2차 항체로 horseradish peroxidase가 결합한 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 다음 TBSS로 3회 씻어 ECL 기질과 1~3분간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool(Gene Gnome5, Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다.

MAP kinase(JNK, ERK, p-38) 발현량 측정

MAPKs의 발현량을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/mL로 18시간 전 배양하고 GCEE를 처리하여 30분 동안 본 배양한 후 p38, ERK, JNK 및 p-p38, p-ERK, p-JNK의 발현량을 검토했기 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. 이후의 실험은 iNOS, COX-2 실험법과 동일하게 진행하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

GCEE의 항염증 효과를 *in vivo* 상에서 알아보기 위하여 Kim 등(23)과 Saraiva 등(24)의 방법으로 귀 부종 측정 실험을 하였다. 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스에 GCEE를 2% Tween 80을 용매로 하여 10, 50 및 250 mg/kg body weight 농도로 제조하고 대조 약물로 사용한 prednisolone을 10 및 50 mg/kg body weight 농도로 하여 200 μ L씩 단회 경구 투여하고 한 시간 후 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 μ L/ear 농도로 도포하였다. 도포 5시간 후 dial thickness gauge(Fowler High Precision Inc., Newton, MA, USA)를 사용하여 귀 두께를 측정하였고 croton oil의 처리로 귀 두께가 증가한 것을 부종의 형성으로 간주하였다. 귀 조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 주름까막살 에탄올 추출물을 100 mg/mL 농도로 20 μ L씩 도포하고 15분 뒤 5% croton oil을 20 μ L씩 도포하였다. 음성대조군 및 양성대조군으로는 각각 2% Tween 80 및 4 mg/mL prednisolone을 20 μ L씩 도포하였다. 6시간 뒤 diethyl ether로 마취사시키고 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin과 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다. 부종 생성율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Edema formation (\%)} = \frac{\text{Sample의 귀 두께}}{\text{Control의 귀 두께}} \times 100$$

통계 처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (ver. 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)에서 평균값

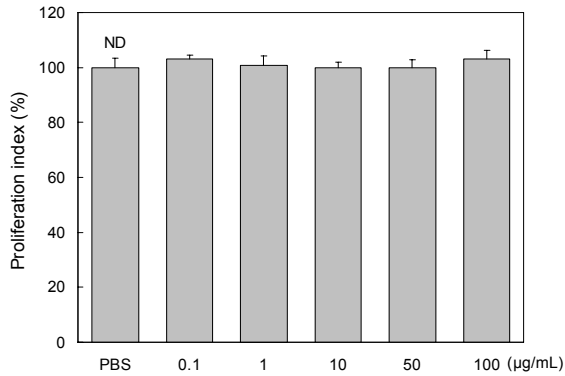


Fig. 1. Effects of *Grateloupia crispata* ethanol extract on proliferation in RAW 264.7 cells. Proliferation index (%)=(absorbance of sample/ absorbance of control)×100. ND: Not significantly different.

을 분산분석한 후, Duncan's multiple range test 법에 따라 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

세포독성 측정

Cell line으로 사용한 대식세포인 RAW 264.7 cell에 미치는 추출물의 독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 주름까막살 에탄올 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하였을 때, 세포의 생존율이 아무것도 처리하지 않은 음성대조군인 PBS 처리구와 비교하여 유의적인 차이가 없는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이를 통해 주름까막살 에탄올 추출물은 0.1~100 µg/mL에서 독성이 없는 것으로 생각하여 염증 억제 활성을 확인하기 위한 추후실험을 같은 농도로 진행하였다.

Nitric oxide 생성 억제 효과

L-Arginine은 NO의 기질로 NOS에 의해 L-citrulline과 NO로 합성되고 이는 빠르게 안정된 상태인 이산화질소와 아질산염, 질산염으로 변하게 된다(25). NO는 반응성이 강한 무기 저분자 라디칼로 혈관 확장, 혈액 응고 및 혈소판 억제 등의 생리적, 병적 인체 내 반응에 중요한 물질이지만, 자극 때문에 필요 이상으로 생성될 경우 신경조직의 손상이나 면역질환을 포함하는 관절염, 다발성 경화증과 같은 병적 반응을 일으키게 되어 인체에 유해하다(26,27). 본 연구에서는 주름까막살 에탄올 추출물이 NO 생성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 cell에서의 NO 생성량을 Griess 시약을 이용해 측정하였다. Griess 시약은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하게 되고 이는 NO의 농도와 일치한다(28). LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 cell의 NO 생성량을 확인한 결과, LPS를 단독으로 처리했을 때 NO 생성량이 25.11 ± 0.15 µM로, 아무것도 처리하지 않은 PBS 처리구의 $2.48 \pm$

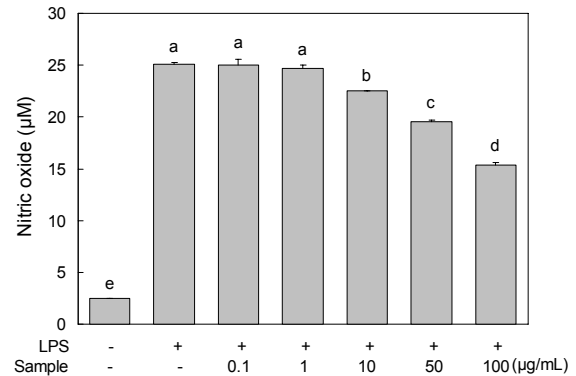


Fig. 2. Effect of *Grateloupia crispata* ethanol extract on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) alone or in combination with GCEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure NO levels.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

0.00 µM보다 약 10배 증가함을 보였다. 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL)의 GCEE를 처리하였을 때, LPS 단독처리구와 비교하여 농도의 의존적으로 NO 생성량을 유의성 있게 감소시킨 것을 확인하였다(Fig. 2). 특히 비교적 낮은 농도인 50 µg/mL에서 22% 이상의 억제 효과를 나타냈다. 이는 홍조류인 가락진두발(10)과 꽃지누아리(11) 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 NO 분비량을 억제한 연구 결과와 유사함을 확인하였다. 이를 통해 주름까막살 에탄올 추출물은 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 NO의 생성 억제에 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

Pro-inflammatory cytokines 생성 억제 효과

IL-6는 대표적인 염증반응의 매개인자로 비만세포로부터 분비되어 B-cell이 plasma 세포로 분화되도록 촉진하고 항체의 분비를 자극하는 사이토카인으로 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다(29). 종양괴사인자인 TNF-α는 macrophage와 mast cell 등에서 분비되는 LPS 반응의 주요 내인성 매개체로서 염증 부위로 사이토카인과 내피세포 부착 분자의 발현을 증가시키며 만성염증 등의 면역반응 수행에 관여한다(30). 전신적으로 분비량이 증가하여 만성염증반응이 발생하면 산화질소나 활성산소 같은 물질의 분비를 촉진해 조직 손상이 발생한다(31). 또한, IL-1β는 세포 성장이나 항상성 유지에 낮은 농도로 필수적인 사이토카인이지만 지속적인 자극 때문에 과다 분비될 경우 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화하여 증상을 악화시키는 사이토카인이다(32). 이러한 전염증성 매개물질을 조절하는 물질은 염증반응으로 유도된 다양한 질병의 발현을 조절할 수 있음을 알 수 있으므로 본 연구에서 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 GCEE의 영향을 알아보았다. 그 결과(Fig. 3) IL-6, TNF-α

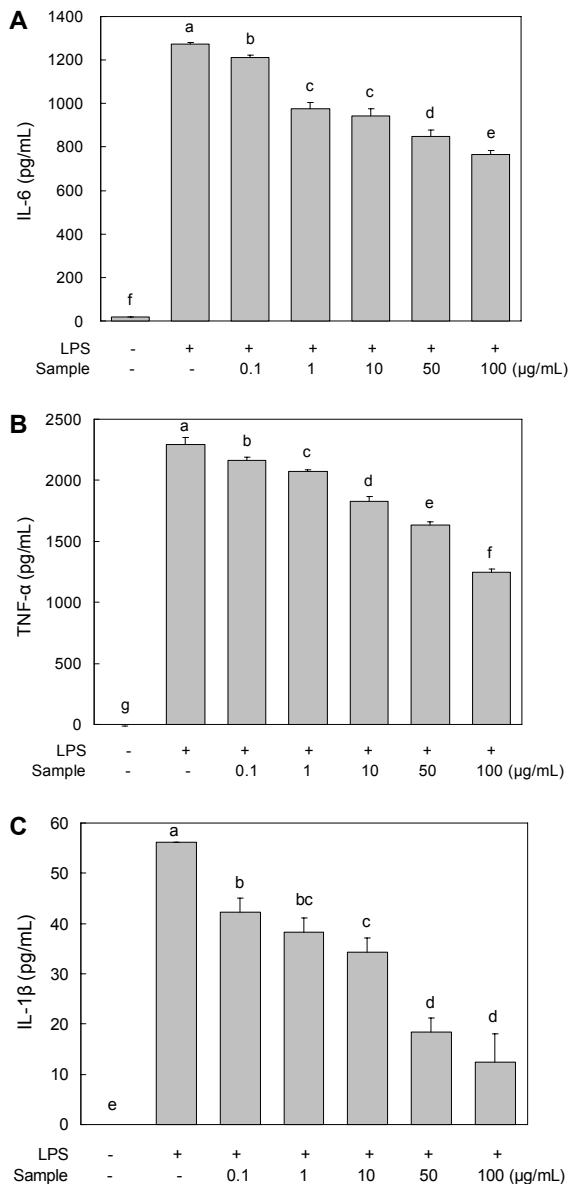


Fig. 3. Effect of *Grateloupia crispata* ethanol extract on production of IL-6 (A), TNF- α (B), and IL-1 β (C) in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 μ g/mL) alone or with various concentrations of GCEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μ g/mL). The levels of pro-inflammatory cytokine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

및 IL-1 β 의 분비량은 염증반응을 유도하는 강한 자극물질인 LPS를 단독으로 처리하였을 시에 각각 1,272.74 \pm 7.03, 2,292.39 \pm 60.74, 56.15 \pm 0.00 pg/mL로 PBS 처리구에 비해 증가하였으며 GCEE의 처리에 따라 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. TNF- α 의 분비량은 100 μ g/mL로 처리하였을 시 LPS 단독 처리구에 비해 약 50% 이상의 억제 효과를 나타내었다. IL-1 β 또한 LPS 처리 때문에 급격히 증가한 분비량을 50 μ g/mL 농도의 GCEE 처리로 68% 이상 억제하는 결과를 확인하였다. 이러한 결과를 종합해볼 때

GCEE는 pro-inflammatory cytokine인 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 분비 억제를 통해 항염증 효과를 나타냄을 유추할 수 있다.

iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현 억제 효과

NOS는 NO의 합성효소로 대표적으로 iNOS, endothelial nitric oxide synthase 및 neuronal nitric oxide synthase 세 종류가 존재하는데, 그중 iNOS는 LPS 자극 때문에 발현되는 대표적인 단백질로 과량의 NO를 생성해 대식세포의 종양이나 박테리아 파괴능력과 같은 면역반응에 관여한다(33). COX는 COX-1과 COX-2의 두 가지 이성체가 존재하는데(34), 세포가 병적 스트레스를 받으면 세포막에서 지방산의 일종인 아라키돈산이 유리되고 이를 원료로 하여 COX-1 효소와 COX-2 효소가 스트레스를 해결하기 위하여 염증 매개물질인 각 prostaglandins(PGs)을 만들어낸다(35). 또한, COX-2는 염증조직, 악성 종양조직에서 정상세포에 비해 많은 양의 PG의 생성을 유도하여 혈관 생성을 촉진하고 세포의 증식을 도울 뿐 아니라 면역 능력을 억제함으로써 암세포 성장에 좋은 환경을 제공하여 또 다른 질병의 병원성과의 직접적인 연관성을 시사하고 있다(36). 현재 임상적으로 상용되고 있는 non-steroidal inflammatory drug 항염증 치료제들은 COX-2의 발현을 억제 조절하는 데 원리를 두고 있다(37). NF- κ B는 염증반응이나 면역반응 등에서 다양한 유전자 발현에 관여하는 전사인자로 정상상태일 때 세포질에서 inhibitor kappa B(I κ B) 단백질과 결합하여 있으나 LPS 자극 때문에 I κ B가 인산화되면 NF- κ B는 핵 내로 이동하여 전염증성 매개체의 유전자 발현을 유도한다. 본 연구에서 확인한 주름까막살 에탄올 추출물의 NO와 사이토카인의 분비 억제 효과가 iNOS 및 COX-2 효소, NF- κ B p65의 발현 조절에 의한 것인지 확인한 결과(Fig. 4), GCEE는 농도 의존적으로 효소 및 전사인자의 발현을 효과적으로 억제하였으며, 특히 iNOS와 COX-2 효소는 100 μ g/mL로 처리하였을 때 약 38% 및 33%의 억제 효과를 보이는 것을 확인하였다. 이는 홍조류인 가락진두발이 NF- κ B, iNOS 및 COX-2의 분비를 농도 의존적으로 저해한 연구 결과와 유사하다(10). 이 결과들은 iNOS와 COX-2 효소의 억제를 통해 NO와 사이토카인의 분비를 억제하였으며 I κ B의 발현 감소로 자유로워진 NF- κ B가 핵으로 전위되는 과정을 GCEE가 효과적으로 억제하여 항염증 효과를 나타내고 있음을 의미한다.

MAP kinase(JNK, ERK, p-38) 발현 억제 효과

MAPKs는 세포의 성장이나 분열, 스트레스나 사이토카인에 의한 세포 내 신호를 전달하는 체계 중 하나로 ERK, JNK/stress-activated protein kinase, serine/threonine protein kinase인 p38 MAPK가 주요한 기전으로 밝혀져 있다(38). 이들 분자에 의한 신호전달은 upstream MAPK kinase에 의해 핵 안으로 이동하여 활성인자의 인산화가 일

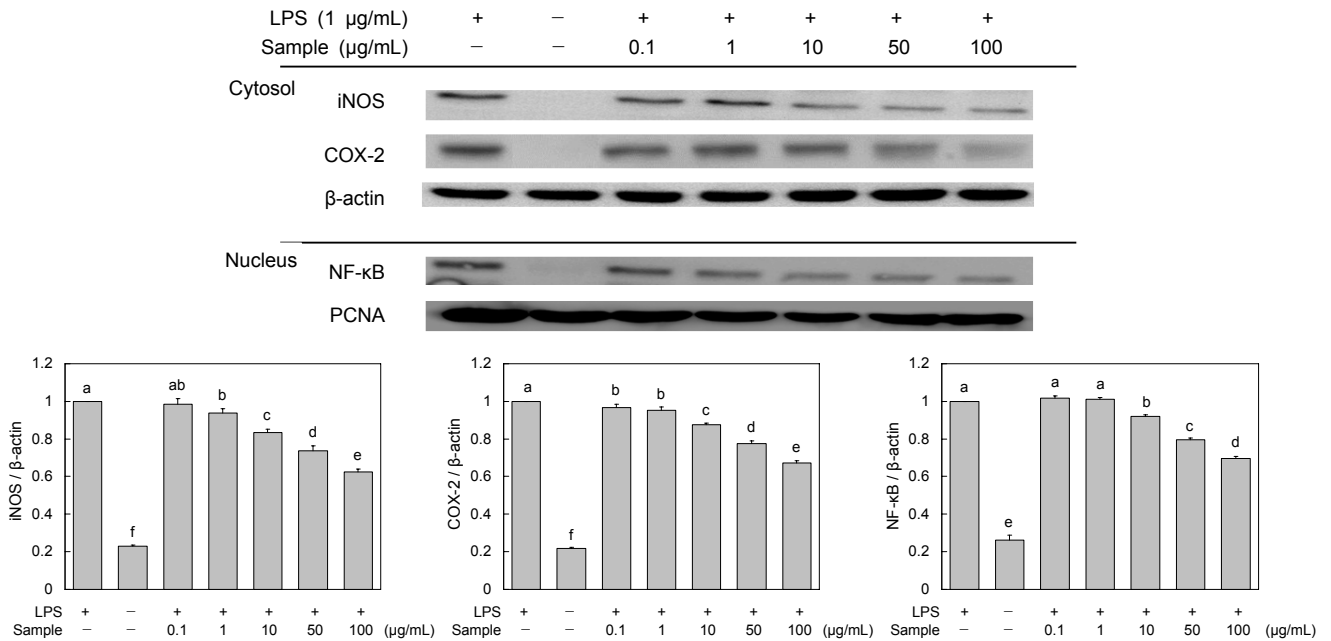


Fig. 4. Effect of *Grateloupia crispata* ethanol extract on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF-κB p65 expression in RAW 246.7 cells. The levels of iNOS, COX-2, and NF-κB p65 in cytosolic or nuclear protein were determined by a western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations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

어남으로써 사이토카인 생성에도 관여한다. 그중 JNK의 경우 IκB kinase의 직접적인 인산화를 통해 NF-κB를 활성화해 염증반응을 일으킨다고 알려져 있다(39). 본 연구에서

주름까막살 에탄올 추출물은 LPS로 유도된 ERK, JNK, p38의 인산화를 농도 의존적으로 유의성 있게 저해하였다(Fig. 5). 특히 p38의 경우 가장 낮은 농도인 0.1 µg/mL로 GCEE

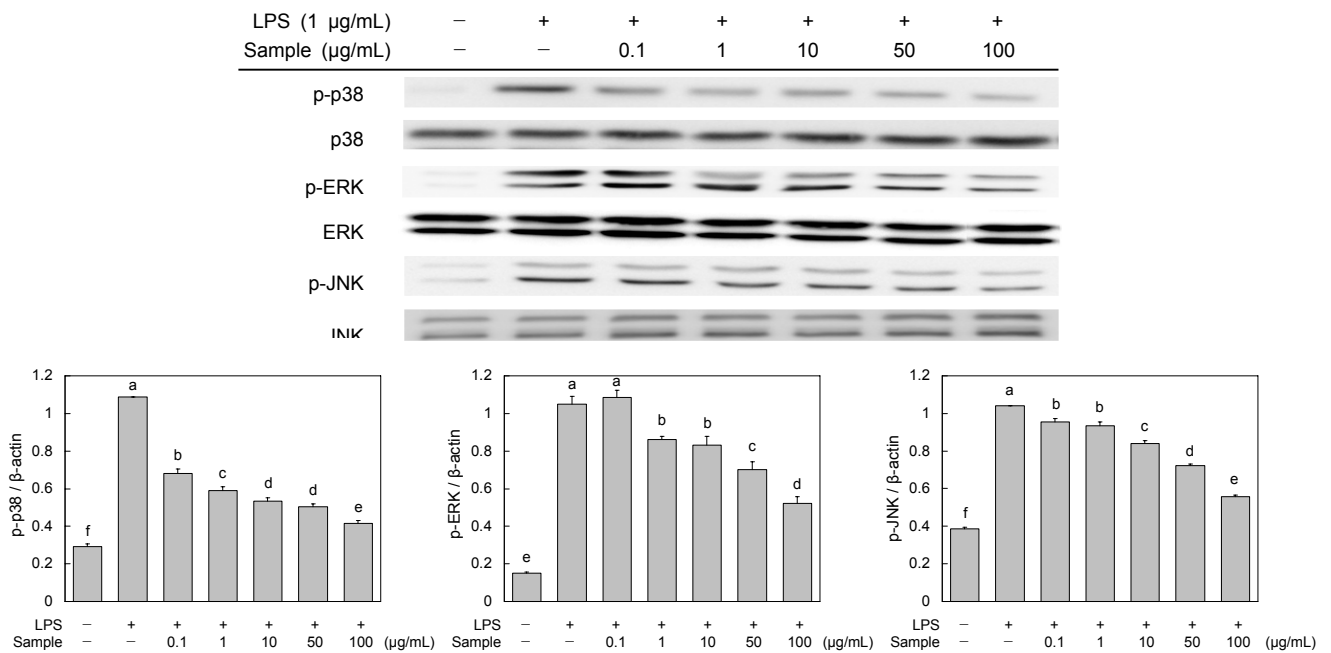


Fig. 5. Effect of *Grateloupia crispata* ethanol extract on MAPKs expression in RAW 246.7 cells. The levels of p-p38, p38, p-ERK, ERK, p-JNK, and JNK in the cytosolic protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of GCEE (0.1, 1, 10, 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 ($P < 0.05$).

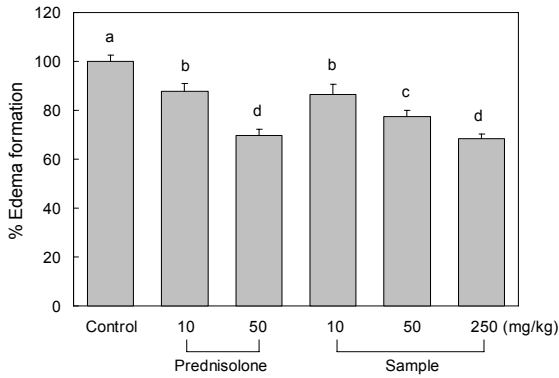


Fig. 6. Inhibition of *Grateloupia crispata* ethanol extract against croton oil-induced mouse ear edema. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

를 처리하였을 때 인산화를 30% 이상 억제하였으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리구에서는 58% 이상의 억제 효과를 나타내어 뛰어난 항염증 효과를 나타낸 것을 확인하였다. 따라서 GCEE는 MAPK family인 ERK, JNK, p38의 신호전달을 억제하여 대식세포에서 항염증 작용을 하는 것을 유추할 수 있었다.

귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

피부는 외부 환경에 의해 손상되었을 때 손상 부위를 복구시키기 위해 염증반응을 일으켜 혈관 확장, 부종 등의 생리 현상이 발생한다. 대표적으로 세포질 내 과립을 다량 가진 비만세포는 활성화되어 protease나 histamine 등과 같은 혈관 확장 물질들을 분비한다(40). Croton oil은 피부에 도포하면 즉각적으로 강한 급성 염증반응을 유도하여 부종을 일으키는 것으로 알려져 있다(41). *In vitro* 상에서 확인한 주름까막살 에탄올 추출물의 염증 억제 활성을 염증반응의 하나인 부종의 완화 효과 및 조직 내의 mast cell 침윤 억제

효과를 통해 *in vivo* 상에서 확인하였다. GCEE를 10, 50 및 250 mg/kg 농도로 마우스에게 경구 투여한 후 croton oil로 염증을 유발하고 부종이 유발된 귀 두께를 측정하였다. 부종실험을 진행한 결과(Fig. 6), croton oil만을 처리하여 부종이 발생한 대조군과 비교 시 GCEE 처리 때문에 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소하였다. 특히 GCEE를 250 mg/kg body weight로 경구 투여했을 때 croton oil만 처리한 군과 비교 시 30% 정도로 귀의 두께가 감소함을 보였으며, 이는 prednisolone을 50 mg/kg 농도로 경구 투여했을 때와 유사한 정도의 억제 효과를 나타내었다. 조직 관찰 결과(Fig. 7) 또한 마찬가지로 같은 경향을 나타내어 croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에 GCEE를 처리하였을 때 prednisolone 처리구와 유사한 정도로 경피 및 진피 두께가 얇아졌다. 또한, GCEE가 toluidine-blue 염색한 진피에서의 mast cell의 침윤을 눈에 띄게 억제하였음을 확인하였다. *In vitro* 상에서 확인한 GCEE의 항염증 효과를 *in vivo* 상에서 확인한 결과, 염증반응인 부종을 완화하고 mast cell의 침윤을 효과적으로 억제한 것으로 보아 항염증제로 이용할 가능성이 충분한 천연물로 생각한다.

요 약

본 연구는 해조류 중에서도 홍조류인 주름까막살 에탄올 추출물(GCEE)의 항염증 효과를 확인하기 위한 실험으로 pro-inflammatory cytokines의 분비량 및 iNOS, COX-2, NF- κ B와 MAPKs의 발현량을 관찰하고 마우스모델에서 항염증 효과를 확인하였다. GCEE가 세포 생존율에 있어 독성을 나타내지 않음을 MTT assay를 통해 확인한 후 같은 농도로 추후실험을 진행하였다. NO 분비량이 GCEE에 의해 농도의존적으로 감소하였으며 전염증성 매개물질인 사이토카인

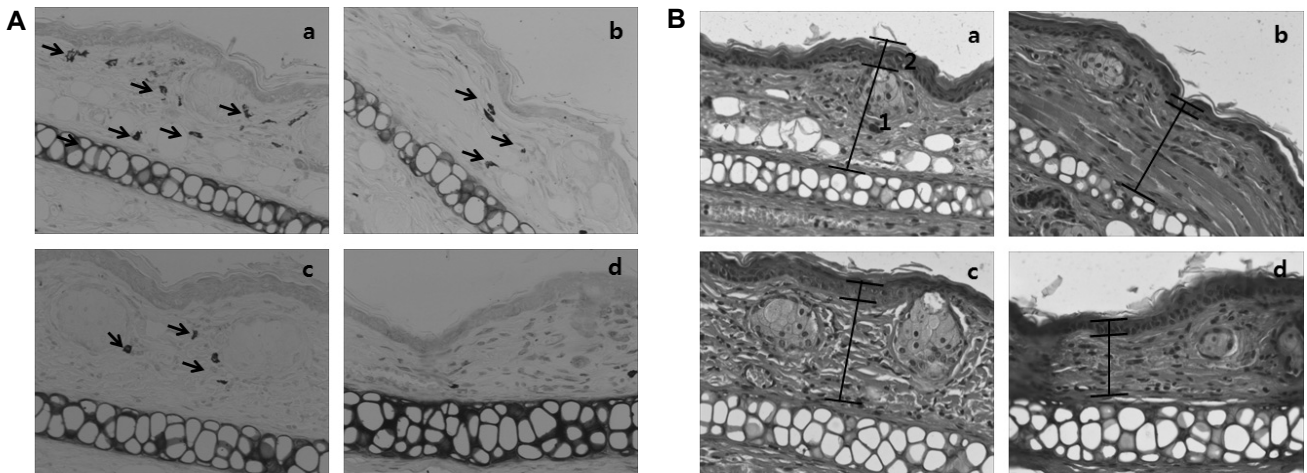


Fig. 7. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of 5% croton oil (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) examined under light microscopy (magnification: 200 \times). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 4 mg/mL (b), and *Grateloupia crispata* ethanol extract 20 $\mu\text{L/ear}$ (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrows indicate mast cell infiltration.

(IL-6, TNF- α 및 IL-1 β)의 분비량 또한 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과가 전염증성 매개인자의 전사인자인 NF- κ B와 MAPKs 경로에 의한 것인지 확인하기 위하여 발현량을 관찰한 결과, GCEE가 LPS 처리로 현저히 증가한 염증 관련 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였고 전사인자인 NF- κ B 및 MAPKs의 발현을 억제하였다. 또한, GCEE는 croton oil로 부종을 유발한 마우스모델에서 귀 부종 억제 효과를 나타내었고 250 mg/kg 농도에서 조직의 경피 및 진피 두께의 발달을 prednisolone 50 mg/kg 처리구와 유사한 정도까지 현저히 억제하고 염증성 세포인 mast cell의 침윤 억제 효과도 확인하였다. 이를 통해 주름까막살 에탄올 추출물은 염증반응의 전사인자인 NF- κ B와 MAPKs의 발현을 조절함으로써 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하고 그에 따라 전염증성 매개인자인 NO, IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 분비를 억제하여 항염증 활성을 가지는 것을 확인하였으며, 이 결과를 종합해 볼 때 주름까막살 에탄올 추출물이 염증 치료제의 소재로 이용될 가치가 충분할 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초 연구 사업입니다(No. 2012 R1A6A1028677).

REFERENCES

1. Trowbridge HO, Emling RC, Fornatora M. 1997. Inflammation. A review of the process. *Implant Dent* 6: 238.
2. 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.
3. Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Choi JW, Jung JH, Park SD. 2008. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Draconis Resina* in mouse macrophage cells. *Kor J Herbol* 23: 179-192.
4. Hinz B, Brune K. 2002. Cyclooxygenase-2 - 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 367-375.
5. Choi C, Cho H, Park J, Cho C, Song Y. 2003. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NF κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1916-1922.
6. Athman R, Philpott D. 2004. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol* 7: 25-32.
7. Beinke S, Ley SC. 2004. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J* 382: 393-409.
8. de Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A. 2012. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc* 71: 332-338.
9. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. 1993. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 119: 1198-1208.

10. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Jang MR, Ahn DH. 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.
11. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Choi JS, Ahn DH. 2016. Anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract on LPS-induced RAW 264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 181-187.
12. Jeong DH, Ahn NK, Choi YU, Park JH, Bae NY, Park SH, Kim KBWR, Ahn DH. 2015. Inhibitory effect of *Sargassum fulvellum* water extract on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Microbiol Biotechnol Lett* 43: 150-157.
13. Park JH, Bae NY, Park SH, Kim MJ, Kim KBWR, Choi JS, Ahn DH. 2015. Antioxidant effect of *Sargassum coraeum* root and stem extracts. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 30: 155-160.
14. Lee YP. 2008. *Marine algae of Jeju*. Academy Publishing Co., Seoul, Korea. p 381.
15. 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.
16. Bae SJ. 2004. Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Chondria crassicaulis*. *J Life Sci* 14: 411-416.
17. 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.
18. 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- κ B in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 29: 985-990.
19. Yee 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.
20. Sheeba MS, Asha VV. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF- α and iNOS expression, which is mediated by NF- κ B regulation, in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 124: 39-44.
21. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
22. 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.
23. Kim DW, Chi YS, Son KH, Chang HW, Kim JS, Kang SS, Kim HP. 2002. Effects of sophoraflavanone G, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2 and *in vivo* inflammatory response. *Arch Pharm Res* 25: 329-335.
24. Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, Menezes KD, Leite GO, Kerntopf MR, Costa JG, Rocha JB, Tomé AR, Campos AR, Menezes IR. 2011. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *J Ethnopharmacol* 136: 504-510.
25. 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 Sci Korea* 32: 111-116.
26. Knowles RG, Moncada S. 1992. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci* 17: 399-402.
 27. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
 28. Seo SW. 2015. The anti-inflammatory effect of *Portulaca oleracea* 70% EtOH extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbol* 30: 33-38.
 29. Cassim B, Mody G, Bhoola K. 2002. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacol Ther* 94: 1-34.
 30. Chu WM. 2013. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* 328: 222-225.
 31. Dinarello CA. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-508.
 32. Huang H, Patel DD, Manton KG. 2005. The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. *Front Biosci* 10: 192-215.
 33. Förstermann U, Sessa WC. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33: 829-837.
 34. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. 1998. Cyclooxygenase and 2. *Anu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97-120.
 35. Sato T, Nakajima H, Fujio K, Mori Y. 1997. Enhancement of prostaglandin E₂ production by epidermal growth factor requires the coordinate activation of cytosolic phospholipase A₂ and cyclooxygenase 2 in human squamous carcinoma A431 cells. *Prostaglandins* 53: 355-369.
 36. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. 1998. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophage: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58: 1208-1216.
 37. Rüegg C, Zaric J, Stupp R. 2003. Non steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 inhibitors as anti-cancer therapeutics: hypes, hopes and reality. *Ann Med* 35: 476-487.
 38. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-183.
 39. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
 40. Seo UK, Lee JI, Park JH, Park YK. 2008. The ethylacetate extract of North Kangwhal (*Ostericum koreanum*) attenuates the inflammatory responses in PMA/A23187-stimulated mast cells. *Kor J Herbol* 23: 81-89.
 41. Towbin H, Pignat W, Wiesenberg I. 1995. Time-dependent cytokine production in the croton oil-induced mouse ear oedema and inhibition by prednisolone. *Inflamm Res* 44: S160-S161.