

Lipopolysaccharide로 유도된 RAW 264.7 세포와 마우스모델에 대한 진두발 에탄올 추출물의 항염증 효과

배난영¹, 김민지¹, 김꽃봉우리², 박지혜¹, 박선희¹, 성낙윤³, 변익홍³, 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³공주대학교 식품공학과

Received: March 21, 2016 / Revised: July 15, 2016 / Accepted: July 29, 2016

Anti-inflammatory Effect of *Chondrus ocellatus* Holmes Ethanol Extract on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells

Nan-Young Bae¹, Min-Ji Kim¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Ji-Hye Park¹, Sun-Hee Park¹, Nak-Yun Sung³, Eui-Hong Byun³, and Dong-Hyun Ahn^{1*}

¹Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 46041, Republic of Korea

³Department of Food Science and Technology, Kongju University, Kongju 32588, Republic of Korea

This study aimed to investigate the anti-inflammatory effect of the ethanol extract from *Chondrus ocellatus* Holmes (COHEE) in RAW 264.7 cells and in a mouse ear edema model, by measuring the production of lipopolysaccharide-induced inflammatory response mediators. There were no cytotoxic effects on the proliferation of macrophages treated with COHEE compared with the control. COHEE inhibited the production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α , and IL-1 β]. The extract also reduced the expression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, nuclear factor- κ B p65, and phosphorylated mitogen-activated protein kinase in a dose-dependent manner. In the croton-oil-induced ear edema model, COHEE decreased the formation of mouse ear edema at the highest dose compared with the control, and histological analysis revealed that the epidermal/dermal tissue thickness and mast cell numbers were reduced. Therefore, these results suggest that COHEE may be a promising topical anti-inflammatory therapeutic material through its action of modulating NF- κ B and the MAPK signaling pathway.

Keywords: *Chondrus ocellatus* Holmes, anti-inflammatory effect, pro-inflammatory cytokines, NF- κ B, MAPKs

서 론

염증은 각종 부상이나 상처, 감염, 세포손상과 같은 유해한 자극이나 물리적 작용, 다른 질병에 대한 방어반응 혹은 다양한 면역세포들의 활성화에 의한 조절작용으로 cytokines, free radical, lysosomal enzyme 등 다양한 매개물질들이 관여한다[35]. 이는 신경변성질환, 관절염, 암, 심혈관 질환 등

의 많은 만성질환에서 근본적인 병태생리학적 기전으로 알려져 있다[37]. 이러한 반응은 면역력에 결함이 생겨 충분한 면역반응이 일어나지 않을 경우 감염을 유도할 수 있으며 면역을 위한 염증 반응이 과도하게 발생하게 되면 기능장애와 같은 조직변질 순환장애와 조직중식을 유발한다[38]. 한편, 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 대식세포는 외부자극에 반응하여 염증반응을 매개함에 따라 interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β 와 같은 전염증성 cytokine을 생성한다. 또한 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase (COX-2)에 의해 생성되는 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

중유발 인자들도 생성된다[26, 32]. 염증이 유발되는 대표적인 경로로는 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 또는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)를 통한 경로가 있다. NF- κ B는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 전사인자로 p50과 p65로 구성되어 인산화 됨에 따라 핵 내로 이동해 iNOS, COX-2 및 염증관련 cytokine을 합성한다[10]. 이러한 염증 유발 경로는 gram-negative bacteria의 세포벽 외층의 절편 혼합물인 lipopolysaccharide (LPS)가 인체 내에서 내독소로 작용하여 활성화 된다. 대식세포의 TLR4 (toll-like receptor 4)와 결합하고 MyD88을 통하여 IRAK의 인산화 및 TRAF6의 활성화를 통하여, I κ B kinase cascade를 통하여 다양한 cytokine을 생성시킨다[18]. 또한 NF- κ B의 활성화는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 kinase를 포함하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있어 NF- κ B와 MAPKs의 신호 전달 경로를 통해 염증성 매개 물질의 발현이 조절되게 된다[18]. 이러한 염증질환을 치료하기 위해 개발된 항염증제는 스테로이드계와 비스테로이드계로 분류할 수 있는데 이러한 항염증제는 위장장애, 신장염 및 심장질환 등을 초래하여 이용이 한정적인 문제점이 있다[25]. 그에 따라 천연자원에서부터 보다 안정적이고 효과적인 항염증제를 개발할 필요성이 대두되고 있으며 최근 몇 년간 일상생활에서도 섭취 가능한 식품을 항염증제로 이용하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있는 실정이다[23].

한편, 해조류는 일상생활에서 섭취 가능한 천연물의 하나로 항산화[29], 고지혈증 개선[22], 항아토피[11], 콜레스테롤 침착 방지[15], 항균[27], 항염증[16] 등의 생리활성이 보고되고 있어 최근 각광받고 있는 천연물이다. 그 중 진두발 (*Chondrus ocellatus* Holmes)은 홍조류 돌가사리과 해조류로 다른 홍조류의 생리활성에 관한 연구[1, 2, 35]에 비해 진두발에 관한 생리활성 연구는 거의 전무한 실정이다. 본 연구에서는 진두발 에탄올 추출물(COHEE)이 LPS로 자극한 대식세포에서 NF- κ B와 MAPKs pathway의 전사활성 저해를 통해 나타내는 항염증 효과를 연구하고 마우스모델에서의 항염증 효과를 관찰함으로써 COHEE를 천연 염증치료제로서 개발의 발판을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

부산 청사포에서 2014년도에 채취한 진두발은 담수로 수회 깨끗하게 수세한 후 자연건조 하였다. 그 후 동결 건조하여 분말화 하였으며 진공 포장상태로 -20°C에서 저장하며 실험에 사용하였다.

진두발 에탄올 추출물 제조

분말상태의 진두발에 10배양의 95% ethanol을 가한 후 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Korea)를 이용하여 24시간 실온에서 추출하였다. 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)로 추출물로부터 상층액을 취하였다. 남은 잔사는 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였고 상층액은 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Japan)로 농축하여 37°C에서 건조시킨 후, -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 에탄올 추출물의 총 폴리페놀, flavone 및 flavanone의 함량은 각각 $1.65 \pm 0.13\%$, $0.05 \pm 0.00\%$, $0.93 \pm 0.00\%$ 이었다(data not shown).

세포배양

한국세포주은행(KCLB 40071, Korea)에서 cell line으로서 murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 분양 받아 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포독성 측정

Park 등 [30]의 방법을 약간 변형해 MTT assay를 실시하여 시료의 세포독성을 평가하였다. 1×10^6 cells/ml의 농도로 RAW 264.7 세포를 96-well plate에 분주하고 20시간 전 배양하여 농도별로(0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/ml) COHEE를 첨가한 후 22시간 본 배양하였다. 5 mg/ml MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) 용액을 첨가하고 2시간 재 배양하였다. 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 걷어내고 dimethyl sulfoxide 100 μ l 분주하여 생성된 formazan을 녹여내 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, 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

배양액 내의 nitrite 농도를 측정하기 위해 Griess 반응[24]을 이용하였다. 2.5×10^5 cells/ml로 조절한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 그 후 COHEE를 0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/ml 처리하고 1 μ g/ml의 LPS로 자극하여 24시간 본 배양하였다. 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻어 정량 실험에 사용하였다. 상층액은 Griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1%

naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)과 배양액을 1:1로 상온에서 10 분간 반응시켜 microplate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

Pro-inflammatory cytokines 분비량 측정

ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, USA)를 이용하여 RAW 264.7 cell의 세포배양액 내의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β cytokine의 분비량을 측정하였다. 세포배양액을 얻기 위해 RAW 264.7 cell을 2.5×10^5 cells/ml로 조절하여 24 well plate에 접종하고 18 시간 전 배양하였다. 그 후 0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/ml 농도별 COHEE와 1 μ g/ml의 LPS를 처리하고 12시간의 본배양을 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 coating시켰다. 이후 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척한 후 10% FBS 용액으로 blocking 하였고 PBST로 세척한 뒤 각 microplate well에 세포 배양 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 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

COHEE가 세포질 내 생성되는 iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, Sheeba와 Asha [34]의 방법에 따라 cytosol 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 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후, 15,520 \times g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였으며 30 μ l의 lysate를 Laemmli [20]의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리

하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등[36]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 발현 양을 검출하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)를 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, 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 COHEE를 처리하여 30분 동안 본 배양한 후 MAPKs의 발현량을 알아보기 위해 anti-mouse c-Jun N-terminal kinase (JNK), p-JNK, extracellular signal-regulated kinase (ERK), p-ERK, p38 protein kinase (p38) 및 p-p38 (Cell Signaling Technology Inc., USA) 항체를 사용하여 1:500으로 희석해서 사용하였다. 이후의 실험은 iNOS, COX-2 실험법과 동일하게 진행하였다.

귀부종 측정 및 조직 관찰

COHEE의 항염증 효과를 *in vivo* 상에서 알아보기 위하여 Kim 등[14]과 Saraiva 등[33]의 방법에 의거하여 귀부종 측정 실험을 실시하였다. 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스에 COHEE를 10, 50 및 250 mg/kg·body weight 농도로 200 μ l 씩 단회 경구 투여하고 한 시간 후, 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 μ l/ear 농도로 도포하였다. 도포 5시간 후 귀 두께를 측정하였고 croton oil의 처리로 귀 두께가 증가한 것을 부종의 형성으로 간주하였다. 귀 조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 진두발 에탄올 추출물을 100 mg/ml 농도로 20 μ l씩 도포하고 15분 뒤, 5% croton oil을 20 μ l씩 도포하였다. 6시간 뒤, diethylether로 마취사 시키고, 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.

Edema formation (%)

$$= \text{Sample의 귀 두께} / \text{Control의 귀 두께} \times 100$$

통계 처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (ver. 9.3, SAS Institute, Inc., USA)에서 평균값을 분산분석한 후, Duncan's multiple range test 법에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

RAW 264.7 cell에 미치는 진두발 에탄올 추출물의 세포독성

추출물이 대식세포에 미치는 독성을 평가하기 위하여 COHEE를 농도에 따라(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) RAW 264.7 cell에 처리하였을 때 세포 생존의 변화여부를 MTT assay를 이용해 측정하였다. 그 결과, 세포의 생존율이 PBS 처리군과 비교 시 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(Fig. 1). 이를 통해 COHEE는 0.1–100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 독성이 없는 것으로 사료되어 염증 억제 활성을 확인하기 위한 추후실험을 동일한 농도로 진행하였다. 이는 참도박 에탄올 추출물의 세포독성 실험 결과, 농도 의존적으로 세포독성이 나타나지 않은 결과[1] 및 잘피 에탄올 추출물의 세포독성 실험결과 독성을 나타내지 않은 결과와 유사하다[20].

Nitric Oxide 생성 억제 효과

NO는 반응성이 강한 무기 저분자 라디칼로 L-arginine을 기질로 하여 NOS에 의해 L-citrulline으로 합성된다. 이는 신경전달기능, 혈액응고 및 혈소판억제, 혈관 확장에 관여하는 neurotransmitter, 암세포에 대항하는 apoptosis 유도작용 등의 인체 내 생리적이거나 병적인 반응에서 중요한 물질로서 알려져 있다. 하지만 여러 세포에서 LPS, interferon- γ (IFN-

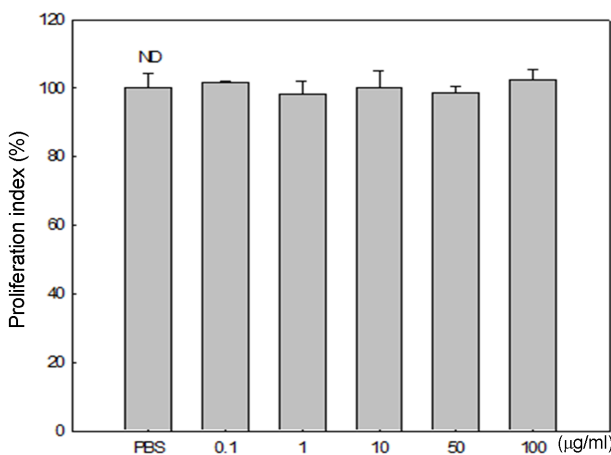


Fig. 1. Effect of *Chondrus ocellatus* Holmes ethanol extract on proliferation in RAW 264.7 cells. Proliferation index (%) = (sample absorbance / control absorbance) \times 100. ND: not significantly different.

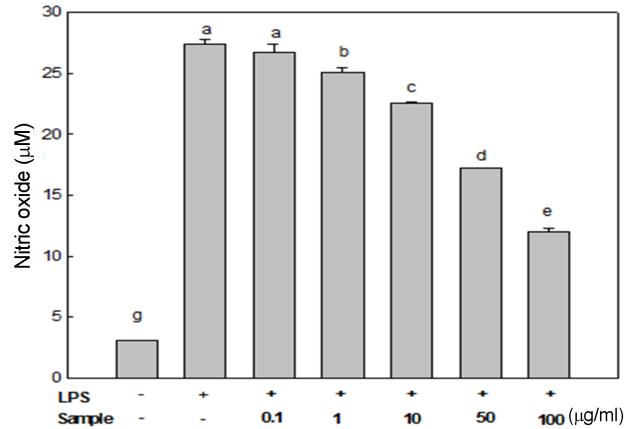


Fig. 2. Effect of *Chondrus ocellatus* Holmes ethanol extract on nitric oxide production in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) alone or in combination with COHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure NO levels. ^{a-g}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

γ), IL-1과 TNF- α 등의 자극에 의해 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 및 면역질환을 포함한 관절염, 기관지염, 다발성 경화증과 같은 병적 반응을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다[19, 27]. 본 연구에서는 진두발 에탄올 추출물이 NO 생성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 cell에서의 NO 생성량을 Griess 시약을 이용해 측정하였다. LPS로 염증반응을 유발한 RAW 264.7 cell의 NO 생성량을 확인할 결과(Fig. 2), LPS를 단독으로 처리했을 때 NO 생성량이 $27.42 \pm 0.36 \mu\text{M}$ 로, 아무것도 처리하지 않은 PBS 처리구의 $3.04 \pm 0.07 \mu\text{M}$ 보다 약 9배 증가함을 보였다. 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)에서 COHEE를 처리하였을 때, LPS 단독처리군과 비교하여 농도 의존적으로 NO 생성량을 유의성 있게 감소시킨 것을 확인하였다. 특히, 비교적 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 35% 이상의 억제효과를 나타냈다. 본 연구 결과는 잘피 에탄올 추출물과 홍조류인 참도박 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 NO 생성량의 억제효과를 보인 결과[1, 19]와 유사함을 확인하였다.

Pro-inflammatory cytokines 생성 억제 효과

COHEE의 염증반응 매개물질인 pro-inflammatory cytokines의 분비 억제 효과를 통해 항염증 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포배양액 내의 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β cytokine의 분비량을 ELISA 방법으로 측정하였다. Pro-inflammatory cytokine은 면역 반응에서 필연적으로 동반되

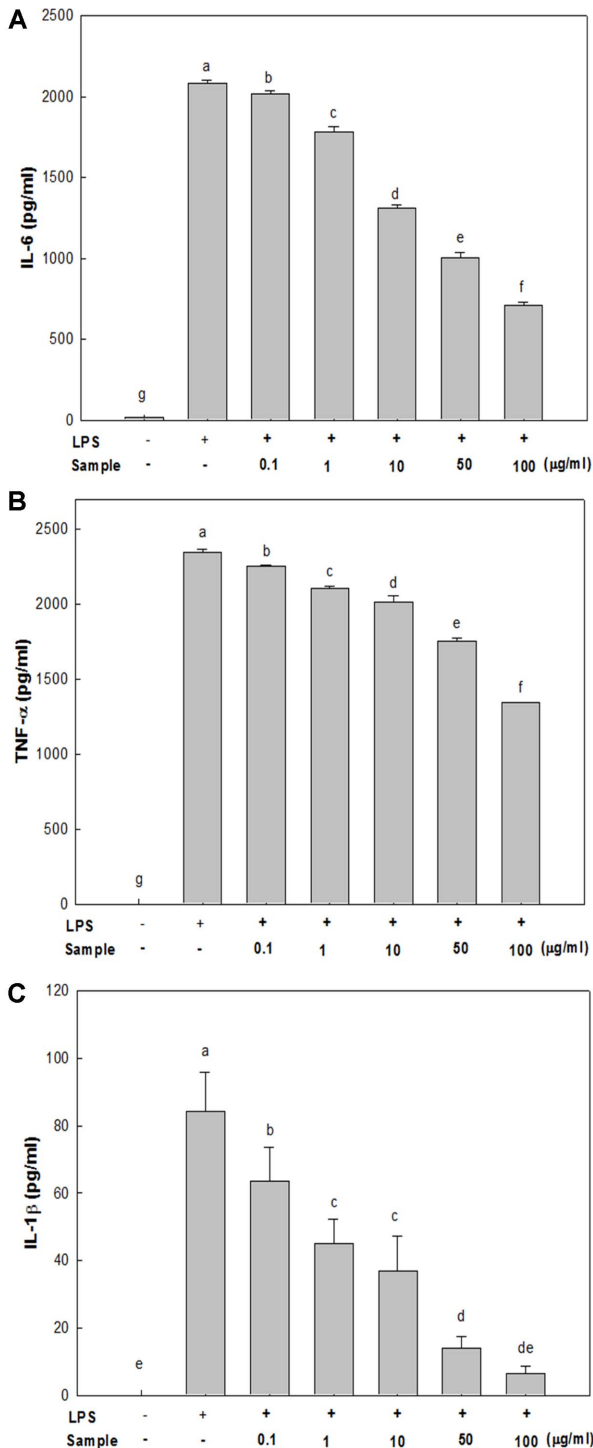


Fig. 3. Effect of *Chondrus ocellatus* Holmes ethanol extract on the production of IL-6 (A), TNF-α (B), and IL-1β (C) in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 μg/ml) alone or with various concentrations of COHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μg/ml). The levels of pro-inflammatory cytokine in the cell culture media were measured by ELISA. ^{a-g}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

는 매개물로 정상조직에서도 발견되지만 과도한 pro-inflammatory cytokine의 분비량 증가는 PGE₂와 NO의 발현으로 이어지게 되고 전신성 염증 반응 증후군, 패혈증 및 심한 조직 손상을 야기한다[9]. 그 중 IL-6는 대표적인 염증 반응의 매개인자로서 T cell, monocyte, macrophage, synovial fibroblast 등의 면역세포에서 발현되는 pro-inflammatory cytokine으로 비만세포로부터 분비되어 B 림프구의 항체 생성을 촉진시키고 T 림프구의 분화를 유도한다[4]. 종양괴사인자인 TNF-α는 LPS 반응의 주요 내인성 매개체로서 T 림프구의 활성화와 성장을 조절하여 염증 부위로의 cytokine과 내피 세포 부착 분자의 발현을 증가시키며 염증부위에서 생성이 증가된다. 전신적으로 분비량이 증가할 경우 eicosanoid, 산화질소, 활성산소 등과 같은 매개물질을 다량 분비시켜 조직 손상을 촉진하게 된다[3]. 또한 IL-1β는 낮은 농도에서는 세포성장이나 항상성 유지에 필수적이지만 염증초기에 분비되어 숙주면역반응의 매개자로서 작용하다가 지속적인 자극에 의해 대량생산될 경우 T cell을 활성화시키고 B cell을 성숙시켜 증상을 악화시킨다[21]. 따라서 이러한 pro-inflammatory cytokine을 조절하는 물질은 염증반응으로 유도된 다양한 질병을 조절할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있다. 본 연구에서 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서의 COHEE의 영향을 알아본 결과(Fig. 3), IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 분비량은 염증반응을 유도하는 강한 자극물질인 LPS를 단독으로 처리하였을 시에 $2081.30 \pm 20.32 \mu\text{M}$, $2334.41 \pm 19.81 \mu\text{M}$, $84.28 \pm 11.74 \mu\text{M}$ 로 PBS 처리구에 비해 약 122, 233 및 84배 증가하였으며, COHEE의 처리에 따라 농도의존적으로 유의성 있게 감소하였다. IL-6 및 TNF-α의 분비량은 각각 50, 100 μg/ml 농도로 처리하였을 시에 LPS 단독 처리구에 비해 약 50% 이상의 억제효과를 나타내었다(Fig. 3A, 3B). IL-1β 또한 LPS 처리에 의해 급격히 증가한 분비량을 COHEE의 처리로 농도에 따라 유의적으로 억제하는 결과를 확인하였다(Fig. 3C). 특히 100 μg/ml 농도로 처리하였을 시에 LPS 단독 처리구에 비해 93% 이상의 억제효과를 나타내어 이는 잔가시모자반 에탄올 추출물이 100 μg/ml 농도에서 94% 이상의 억제효과를 나타낸 것[12]과 비교하였을 때 매우 뛰어난 항염증 효과를 가짐을 알 수 있다.

iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현 억제 효과

LPS나 cytokine과 같은 전염증성 매개물질은 NF-κB를 활성화 시켜 iNOS와 같은 효소를 유도하여 장시간동안 다량의 NO를 생성시켜 세포독성, 유전자 변이, 신경손상, 조직 손상 등과 함께 혈관투과성을 증가시켜 염증반응을 심화시킨다. 또한 COX-2는 arachidonic acid를 세포막의 인지질로부터 염증매개 물질인 PGE₂, thromboxane A2, prostacyclin의 생성에 관여하는 효소로 종양의 세포사멸을 억제하고 혈

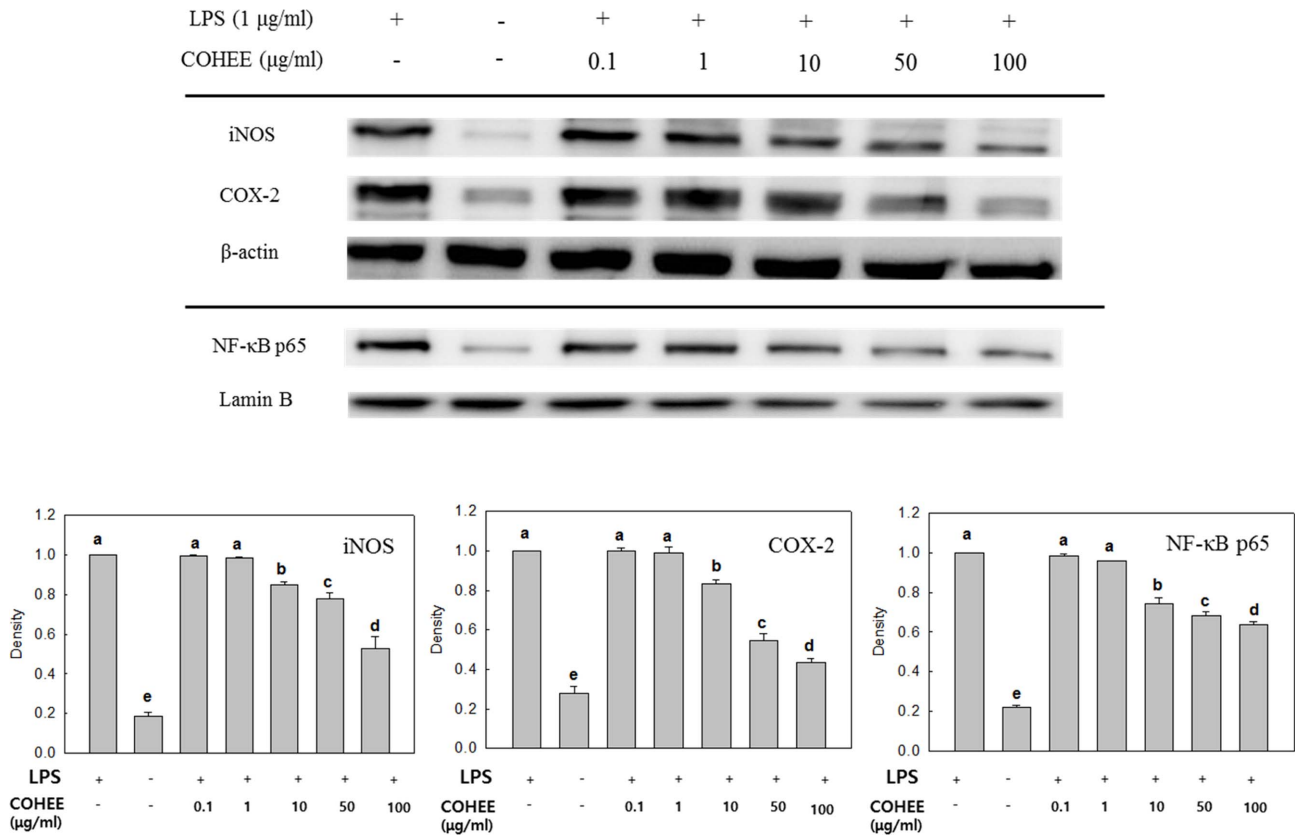


Fig. 4. Effect of *Chondrus ocellatus* Holmes ethanol extract on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF-κB p65 expression in RAW 246.7 cells. The levels of iNOS, COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF-κB in nuclear protein were determined by a western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of COHEE (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 superscripts (a-e) are significantly different ($p < 0.05$).

관 생성을 유도하는 데 관여한다[7]. NF-κB는 염증반응과 관련된 유전자의 promoter에 결합하여 iNOS, COX-2의 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다[5]. COHEE가 이러한 염증 매개인자를 생합성하는 효소인 iNOS와 COX-2, NF-κB의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot에 의해 조사한 결과, COHEE는 농도 의존적으로 단백질들의 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과로 COHEE에 의한 NF-κB의 발현 억제로 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함으로써 NO 및 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

MAP kinase (JNK, ERK, p-38) 발현 억제 효과

MAPKs는 지금까지 잘 알려진 세포 내 신호전달체계 중 하나인데 그 경로들 중 ERK, JNK/stress-activated protein kinase (SAPK), p38 MAPK가 주요한 기전으로 밝혀져 있다. 외부 자극에 반응해서 상위 MAPK kinases에 의해 인산화

가 일어남으로써 활성화된다. MAPKs는 LPS나 TNF-α와 같은 염증자극에 반응해 활성화되어 다른 kinase, 전사인자들이 활성화 되도록 하고 세포의 성장, 분열, 스트레스나 cytokine에 의한 세포반응을 조절한다[31]. 이러한 인산화된 MAPKs의 발현량을 분석한 결과, RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 p-p38, p-ERK, p-JNK의 발현이 진두발 에탄올 추출물의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5). 이는 COHEE가 NF-κB의 활성화 억제와 함께 MAPKs의 인산화를 억제함으로써 염증 매개성 물질들의 발현을 조절하여 항염증 효과를 나타냄을 시사한다.

귀부종 억제 효과 및 조직 관찰

진두발 에탄올 추출물이 염증반응의 하나인 부종의 완화 효과 및 조직 내의 mast cell 침윤 억제효과를 확인하기 위해 10, 50 및 250 mg/kg 농도로 경구 투여한 후 croton oil로 염증을 유발하고 귀 두께를 측정하였다. 피부는 외부 환경에

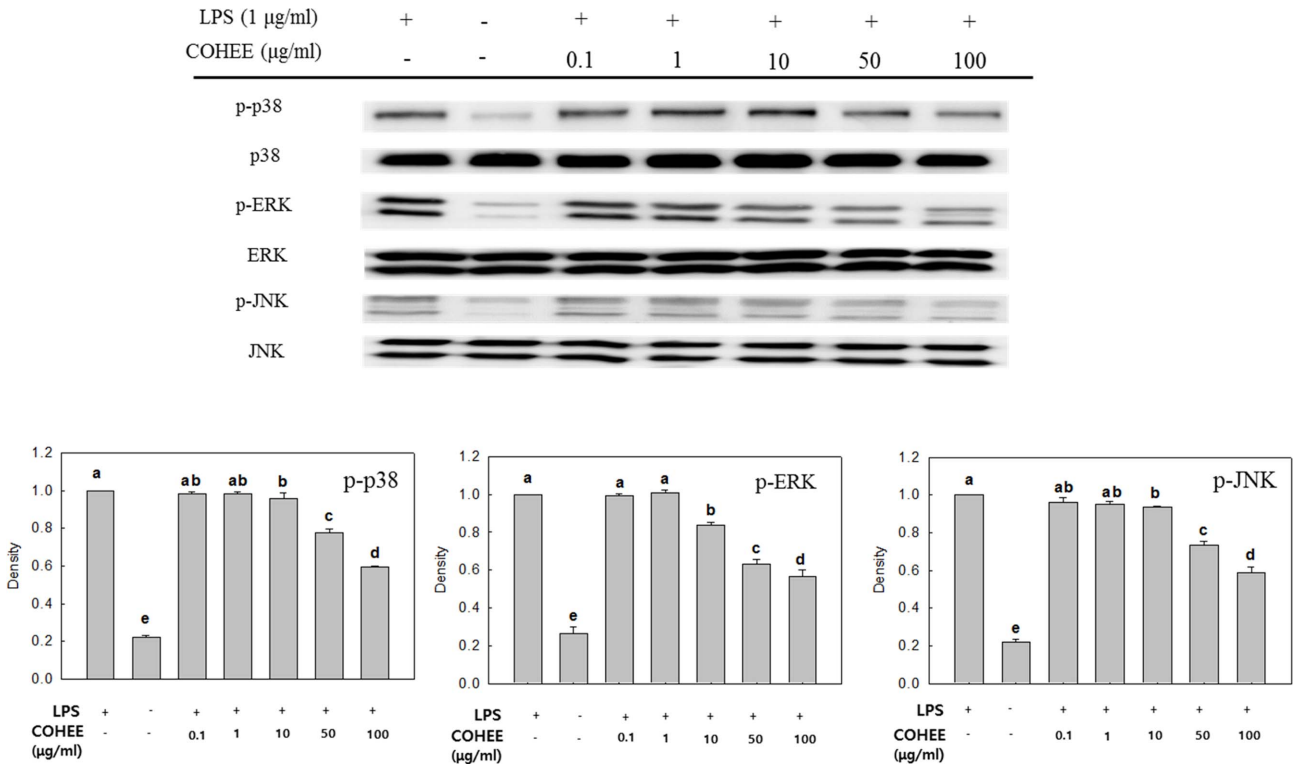


Fig. 5. Effect of *Chondrus ocellatus* Holmes ethanol extract on MAPKs expression in RAW 246.7 cells. The levels of p-p38, p-ERK, and p-JNK in the cytosolic protein were determined by western blot analysis. RAW 246.7 cells were treated with the indicated concentrations of COHEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 30 min, and the proteins were detected using specific antibodies. Means with different superscripts (a-e) are significantly different ($p < 0.05$).

의해 손상된 부위를 복구시키기 위해 염증반응을 일으켜 혈관확장, 부종 등의 대표적인 생리 현상이 발생하고 세포질 내 과립을 다량 가진 비만세포는 활성화되어 protease나 histamine 등과 같은 혈관확장 물질들을 분비한다[8, 33]. Croton oil은 강력한 피부 자극제로서, phorbol esters, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)와 같은 물질을 함유하고 있어 피부에 도포하면 즉각적으로 강한 급성 염증 반응을 유도하게 된다. 이와 같은 물질은 PGE₂ 및 leukotriene B₄ (LTB₄)의 생성을 증가시키며, 조직 내로 mast cell이나 백혈구들의 침윤을 도와 피부의 급성염증 반응에 관여한다[6]. 특히 혈관이 확장되고 조직 내로 면역세포들이 침윤되는 현상은 protein kinase C (PKC)의 활성화에 의해 자극되는데, 이는 phospholipase A2 (PLA2)의 활성을 증가시켜 arachidonic acid의 분비를 증가시키고 prostaglandin 및 leukotriene과 같은 대사산물을 분비시킨다. 또한 면역세포로부터 pro-inflammatory cytokine 및 chemokine의 생성에 관여함으로써 피부의 급성 염증반응을 일으키게 된다[32]. 따라서 진두발 에탄올 추출물을 도포하여 croton oil로 유발된 귀 부종의 완화 정도를 관찰한 결과(Fig. 6), croton oil만을 처리하

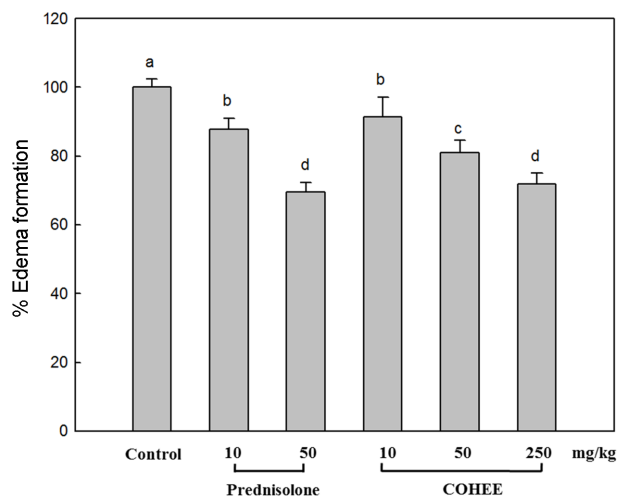


Fig. 6. Inhibition of *Chondrus ocellatus* Holmes ethanol extract against croton oil-induced mouse ear edema. ^{a-d}Means with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

여 부종이 발생한 대조군과 비교 시 COHEE 처리에 의해 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소하였으며, 특히, 현

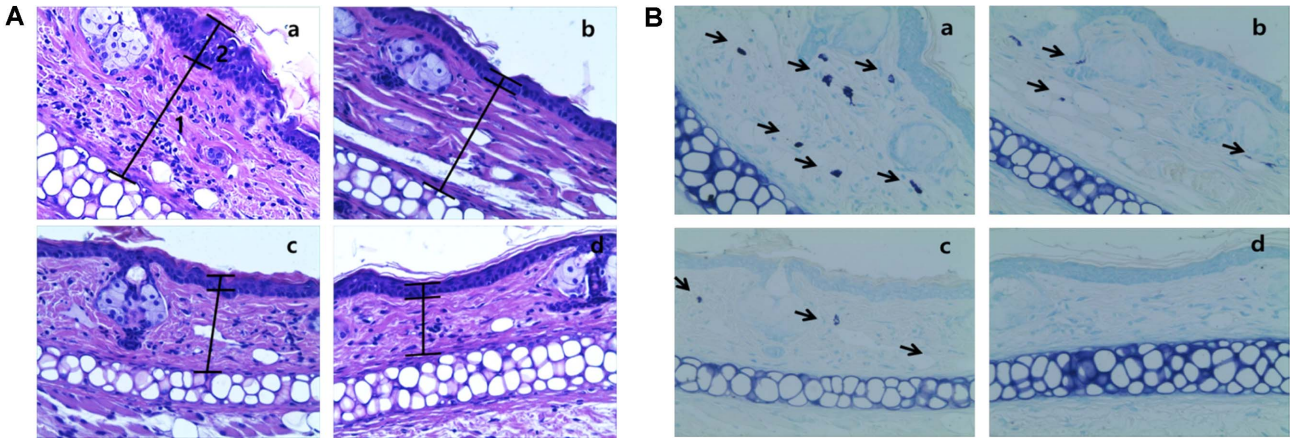


Fig. 7. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of 5% croton oil (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) examined under light microscopy (magnification: 200×). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b) and *Chondrus ocellatus* Holmes ethanol extract 20 μl/ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrows indicate mast cell infiltration.

재 사용되고 있는 합성 스테로이드제인 prednisolone을 50 mg/kg 농도로 경구 투여했을 때와 250 mg/kg body weight로 경구 투여 했을 때의 귀 부종 억제효과가 30%로 유사한 정도를 나타내었다. 이러한 결과는 조직 관찰 결과와 유사하였는데 조직 관찰 결과(Fig. 7), croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에 COHEE를 처리하였을 때 prednisolone 처리구와 유사한 정도로 경피 및 진피 두께가 얇아졌다. 또한 COHEE가 toluidine-blue 염색한 진피에서 mast cell의 침윤을 눈에 띄게 억제하였음을 확인하였다. 이는 잔가시 모자반[12], 외톨개 모자반[13]을 이용한 항염증 효과에서 추출물 250 mg/kg body weight 처리구에서 대조구인 prednisolone 50 mg/kg body weight와 비슷한 귀부종 억제 및 조직학적으로 mast cell 침윤 억제 및 경피/진피 두께 감소 결과와 유사하다. 이 외에도 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 항염증 효과에서 250 mg/kg body weight 처리구에서 약 46%의 귀부종 완화 효과를 보고한 바 있다[17].

요 약

본 연구는 COHEE의 항염증 효과를 확인하기 위한 실험으로써 pro-inflammatory cytokine의 분비량 및 iNOS, COX-2, NF-κB와 MAPKs의 발현량을 관찰하였다. 먼저 MTT assay를 통해 COHEE가 세포 생존율에 있어 독성을 나타내지 않음을 확인한 후 동일한 농도로 추후실험을 진행하였다. COHEE에 의해 NO 분비량이 농도 의존적으로 감소하였으며 IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 분비량 또한 유의적으로 감소하였다. 특히 100 μg/ml의 농도에서 LPS 단독처리

구인 대조구에 비하여 IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 분비량을 각각 66%, 43% 및 93% 억제시켰다. 이러한 결과가 전염증성 매개인자의 전사인자인 NF-κB와 MAPKs 경로에 의한 것인지 확인하기 위하여 발현량을 관찰한 결과, COHEE가 LPS 처리에 의해 현저히 증가한 단백질의 발현을 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였다. 또한 COHEE는 croton oil로 부종을 유발한 마우스모델에서 귀부종 억제효과를 나타내었고 250 mg/kg 농도에서 조직의 경피 및 진피 두께의 발달을 prednisolone 10 mg/kg 처리구와 유사한 정도까지 현저히 억제시키고 염증성 세포인 mast cell의 침윤 억제 효과도 확인하였다. 이를 통해 COHEE는 염증 반응의 전사인자인 NF-κB의 발현을 조절함으로써 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하고 그에 따라 전염증성 매개인자인 NO, IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 분비를 억제하여 항염증 활성을 가지는 것을 확인하였으며, 이 결과를 종합해볼 때, COHEE가 염증 치료제로써의 소재로 이용될 가치가 충분할 것으로 사료된다.

Acknowledgments

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

References

1. Bae, NY, Kim MJ, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Park JH, et al. 2015. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Grateloupia elliptica* Holmes on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells and mice ears. *Korean Soc. Biotech-*

- nol. Bioeng. J.* **44**: 1128-1136.
2. Bae SJ. 2004. Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Chondria crassicaulis*. *J. Life Sci.* **14**: 411-416.
 3. Balkwill FR, Maylor MS, Malik S. 1990. Tumor necrosis factor as an anti-cancer agent. *Eur. J. Cancer. Clin. On.* **26**: 641-644.
 4. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. 2002. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB regulate *H. pylori*-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem. J.* **366**: 376-382.
 5. Celec P. 2004. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine: the next generation. *Biomed. Pharmacother.* **58**: 365-371.
 6. Daniela AC, Henrique HM, Priscila I, Cintia DS, Evelise FP, Daniel AGBM, et al. 2010. Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola L.* in mice. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2011**: 1-7.
 7. Duerksen-Hughes PJ, Day DB, Laster SM, Zachariades NA, Aquino L, Gooding LR. 1992. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J. Immunol.* **149**: 2114-2122.
 8. Hahm DH, Sur BJ, Han DO, Park JH, Jung ET, Lee HJ, et al. 2008. Anti-inflammatory activity of *Dandelion* in mice. *J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **22**: 810-814.
 9. 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.
 10. Jeon JW, Park BC, Jung JG, Jang YS, Shin EC, Park YW. 2013. The soluble form of the cellular prion protein enhances phagocytic activity and cytokine production by human monocytes via activation of ERK and NF-kappaB. *Immune Netw.* **13**: 148-156.
 11. Jeong DH, Ahn NK, Choi YU, Park JH, Bae NY, Park SH, et al. 2015. Inhibitory effect of *Sargassum fulvellum* water extract on 2,4-dinitrochlorobenzene -induced skin lesions in mice. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 150-157.
 12. 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.
 13. Jeong DH, Kim KBWR, Kim MJ, Kang BK, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of methanol extract and n-hexane fraction mojabanchromanol b from *Myagropsis myagroides*. *Life Sci.* **114**: 12-19.
 14. Kim DW, Chi YS, Son KH, Chang HW, Kim JS, Kang SS, et al. 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.
 15. 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.
 16. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Cho YJ, et al. 2015. Anti-Inflammatory Effect of *Zostera marina* ethanolic extract on LPS induced RAW 264.7 cells and mouse model. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **30**: 182-190.
 17. Kim MJ, Kim KBWR, Jeong DH, Ahn DH. 2013. Anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Sargassum sagamianum* in RAW 264.7 cells. *Food Sci. Biotechnol.* **22**: 1113-1120.
 18. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, et al. 2008. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br. J. Pharmacol.* **154**: 165-173.
 19. Knowles RG, Moncada S. 1992. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 399-402.
 20. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 21. Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. 2000. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. *Mol. Hum. Reprod.* **6**: 269-275.
 22. Lee JH, Kim ND, Choi JS, Kim YJ, Heo MY, Lim SY, et al. 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.
 23. Lee SE, Lee JH, Kim JK, Kim GS, Kim YO, Soe JS, et al. 2011. Anti-inflammatory activity of medicinal plant extracts. *Korean J. Med. Crop Sci.* **19**: 217-226.
 24. 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.
 25. Makins R, Ballinger A. 2003. Gastrointestinal side effects of drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2**: 421-429.
 26. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.
 27. 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.
 28. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.
 29. Park JH, Bae NY, Park SH, Kim MJ, Choi JS, Ahn DH. 2015. Antioxidant effect of *Sargassum coreanum* root and stem extracts. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **30**: 155-160.
 30. Park YM, Won JH, Yun KJ, Ryu JH, Han YN, Choi SK, et al. 2006. Preventive effect of *Ginkgo biloba* extract (GGB) 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.
 31. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**: 153-183.
 32. Sadegh A, Fatemeh EF, Mohd KH, Zuraini A, Abdul MMJ. 2012. Effects of Haruan (*Channa striatus*) based cream on acute inflammation in croton oil induced mice ear edema model. *Res. J. Biol. Sci.* **7**: 181-187.
 33. Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, Menezes KD, Leite GO, Kern-topf MR, et al. 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.
34. Sheeba MS, Asha VV. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF-alpha and iNOS expression, which is mediated by NF-kappaB regulation, in RAW264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **124**: 39-44.
35. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. 1994. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in *ex-vivo* xenogeneic kidney perfusion. *Transpl. Int.* **7** (Suppl 1): S647-S649.
36. Towbin HT, 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.
37. Trowbridge HO, Emling RC, Fornatora M. 1997. Inflammation. A review of the process. *Implant. Dent.* **6**: 238-278.
38. Willoughby DA. 1975. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **34**: 471- 478.