

Lipopolysaccharide로 자극된 RAW 264.7 세포와 마우스 귀부종 모델에 대한 참치 심장 Dichloromethane 분획물의 항염증 효과

김민지¹, 배난영¹, 최현덕², 김꽃봉우리¹, 박선희¹, 성낙윤³, 변익홍³, 남희섭⁴, 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³공주대학교 식품공학과

⁴㈜동원 F&B 동원식품과학연구원

Received: September 28, 2016 / Revised: December 14, 2016 / Accepted: December 15, 2016

Anti-Inflammatory Activity of Dichloromethane Fraction from *Katsuwonus pelamis* Heart in LPS-Induced RAW 264.7 Cells and Mouse Ear Edema

Min-Ji Kim¹, Nan-Young Bae¹, Hyeun-Deok Choi², Koth-Bong-Woo-Ri Kim¹, Sun-Hee Park¹, Nak-Yun Sung³, Eui-Hong Byun³, Hee-Sup Nam⁴, 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, Chungcheongnam-do 32588, Republic of Korea

⁴Research & Development Center, Dongwon F&B, Gyunggi-do 13213, Republic of Korea

This study investigated the effect of the dichloromethane fraction from *Katsuwonus pelamis* heart on anti-inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells and mouse models. Ethanol extract was partitioned with dichloromethane, ethyl acetate, butanol, and water. Among the fractions, the dichloromethane fraction showed a significant decrease in nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α] production compared to ethanol extract. The dichloromethane fraction attenuated the expression of inducible nitric oxide synthase and nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 proteins in a dose-dependent manner. In addition, the expression of phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) was also inhibited by the dichloromethane fraction. Moreover, the administration of 10, 50, and 250 mg/kg body weight-dose dependently inhibited the formation of edema by croton-oil and the application of dichloromethane (2 mg/ear) significantly reduced epidermal and dermal thickness and the infiltrated mast cell numbers. Therefore, the dichloromethane fraction exhibited an anti-inflammation effect by inhibiting NF- κ B and MAPK signaling activation in macrophages.

Keywords: *Katsuwonus pelamis* heart, anti-inflammation, mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- κ B, ear edema

서론

염증은 인체에 외부에서 들어오는 오염물질, 내독소, 세균 감염등과 같은 외부 자극과 내인적으로 발생하는 염증인자를 인지하여 제거하기 위한 방어기전이다. 적절한 염증반응은 외인적/내인적 인자로부터 인체를 보호하는 필수적인 반

응이지만, 지속적인 염증반응은 통증, 발열 등과 같은 기능장애, 정상 조직의 파괴와 암 등과 같은 다양한 질병의 원인으로 작용할 수 있다[1]. 염증반응에 관여하는 대표적인 세포 중 하나인 대식세포(macrophage)는 염증반응 시, interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등과 같은 pro-inflammatory cytokine과 nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증유발 인자를 생성하고, 면역세포를 활성화시킨다[2]. 이러한 cytokine의 발현은 mitogen-activated protein kinases (MAPK)와 nuclear factor kappa B (NF-

*Corresponding author

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

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

κB)에 의해 조절된다[3]. 활성산소종, lipopolysaccharide (LPS) 등과 같은 염증성 자극에 의해 NF-κB와 결합해 있던 Iκ-Bα의 분해되어 NF-κB가 활성화 되면 세포질에서 핵안으로 들어가 전사인자로서 cytokine의 발현 및 염증 유발 인자의 발현을 유발한다[4]. MAPK 중 extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 c-Jun NH₂-terminal kinases (JNK), p38은 대식세포의 NO 생성과 LPS로 자극된 iNOS 유도에 관련이 있다고 알려져 있다[5]. 이러한 염증을 유도하는 MAPK와 NF-κB의 활성을 저해하고 조절할 수 있는 물질을 탐색함으로써 부작용을 가진 스테로이드 및 비스테로이드성 항염증제가 아닌 천연물 유래의 대체제를 찾기 위한 연구가 진행되고 있다[6].

참치(*Katsuwonus pelamis*)는 농어목 고등어과의 바닷물 고기로 고단백이면서 저지방, 저칼로리 식품으로써 최근 성인병을 예방하는 건강식품으로 각광받고 있는데 이는 다가 불포화 지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA, 22:5n-3)와 docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3)를 다량 함유하고 있다[7]. EPA와 DHA는 혈액 내 중성지방, 콜레스테롤 수치를 감소시키고, 혈소판 응집을 감소시켜 심혈관계 질병인 동맥경화와 심장질환을 예방뿐만 아니라 항암활성에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[8-10]. 참치는 세계적으로 어획량이 연간 400만 톤에 달하며 어획된 참치는 주로 통조림 제조에 이용되며 참치 통조림 가공 시, 전체 원료의 30-35% 정도의 부산물이 발생하며, 이러한 부산물인 껍질, 자숙액, 뼈, 심장 및 내장의 일부는 조미료로 이용되기도 하며 대부분은 사료로 사용되거나 폐기되어 환경문제를 야기시킨다[11]. 참치 부산물에 대한 연구로는 참치 정소 핵산 복합물질이 면역 활성에 미치는 영향[12], 참치 지느러미 추출물의 암세포 독성 및 quinone reductase 활성 증가 효과[13] 등 일부만 연구되어 있는 실정이고, 다양한 참치 부산물의 효율적인 회수와 기능적으로 사용할 수 있는 방법의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 참치 부산물의 하나인 참치 심장을 ethanol로 추출하여 dichloromethane으로 분획한 후 대식세포에서 염증 매개물질들의 생성 억제 효과 및 귀부종 억제효과를 측정하여 염증 치료제의 소재로 활용 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

참치 심장 ethanol 추출 및 용매별 분획 제조

본 실험에 사용한 참치심장 분말은 (주)동원 F&B (Korea)에서 제공받았으며 분말 상태의 참치 심장 분말은 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Korea)를 이용해 70% ethanol을 가한 후 3시간 동안 교반시킨 후 3회 추출하였다. 추출물은 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)로 1,977 ×g에 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 남은 잔사는 동일

한 방법으로 추출하였고 상층액은 37°C에서 감압 농축기(RE200, Yamoto Co., Japan)로 농축하여 얻었다. 70% ethanol 추출물은 water에 용해시키고, dichloromethane을 water와 동일한 양으로 넣어 dichloromethane 분획물을 얻었다. 그 water 층을 ethyl acetate, butanol의 순서로 분획물을 제조하고, 나머지 용액을 water 분획물로 사용하여, 각 분획물을 감압 농축기를 이용하여 농축하였다.

세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum (Hy-Clone Laboratories, Inc., USA)과 1% penicillin/streptomycin (Hy-Clone Laboratories, Inc.)을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다[14]. RAW 264.7 세포를 1 × 10⁶ cells/ml의 농도로 96-well plate에 분주하고 20시간 동안 전 배양 후, 참치 심장 dichloromethane 분획물을 농도별로 첨가하여 22시간 동안 배양하였다. 배양 후, 5 mg/ml의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약 (Sigma Chemical Co., USA)을 첨가하여 2시간 배양하였다. 이를 4°C, 879 ×g에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Korea)하여 상층액을 걷어내고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., USA)를 100 μl 분주하여 생성된 formazan을 녹여내 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation index (\% of control)} =$$

$$\text{Absorbance of sample/Absorbance of control} \times 100$$

Nitric oxide 생성량 측정

Griess 반응[15]을 이용하여 배양액 내에 존재하는 nitrite 농도를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 2.5 × 10⁵ cells/ml의 농도로 24-well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 μg/ml의 LPS와 참치 심장 용매별 분획물을 각 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 상층액과 griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader

(Model 550)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정

Pro-inflammatory cytokine 분비 억제 효능을 알아보기 위하여, RAW 264.7 세포를 2.5×10^5 cells/ml로 24-well plate에 접종하고 18시간 동안 전 배양하였다. 세포에 1 µg/ml의 LPS와 시료를 각 농도별로 처리하여 12시간 재 배양하였다. 배양액 내의 IL-6, TNF-α 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse IL-6, TNF-α 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating하였으며, 이를 0.05% tween 20을 포함하는 PBST (Phosphate buffered saline with 0.05% tween 20)로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척 후, 각 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 후 biotinylated anti-mouse IL-6, TNF-α detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1β의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 암반응시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 microplate reader (Model 550)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blotting

배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, 세포질 단백질 추출의 경우, lysis buffer [50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 µg/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40]를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후, 14,240 ×g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 핵 내 단백질 추출의 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 15,520 ×g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 사용하여 정량하였으며, 30 µl의 lysate를 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Bio-rad)에 70 mA에서 1시간 30분 동안 전사시킨 후, 5% skim milk가

포함된 TBSS (tris buffered saline; pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. iNOS, COX-2 및 NF-κB p65의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF-κB p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)를 사용하였으며, MAPKs의 발현량을 알아보기 위해 anti-mouse p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-p38 및 p38 (Cell Signalling Technology Inc., USA) 항체를 사용하여 1:500으로 희석해서 사용하였다. 각각 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBSS로 3회 세정하여 ECL (Thermo Scientific, USA) 기질과 1-3분간 반응한 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool (Syngene software, Synoptics Ltd., UK)를 이용하여 가시화 및 정량하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

귀 부종을 측정 위해 ICR 마우스에 참치 심장 dichloromethane 분획물을 10, 50 및 250 mg/kg·body weight 농도로 200 µl씩 경구 투여하고 한 시간 후, 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 µl/ear 농도로 도포하였다. 귀 두께는 croton oil을 처리하고 5시간 후에 측정하였으며 croton oil 처리한 후 두께의 증가를 부종의 형성으로 간주하였다. 귀 조직 관찰을 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 참치 심장 dichloromethane 분획물을 100 mg/ml 농도로 20 µl씩 도포하였고, 6시간 뒤, diethylether로 마취시키고, 귀조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하여 hematoxylin-eosin과 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

Edema formation (% of control) =

Ear thickness of Sample / Ear thickness of Control × 100

통계처리

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

결과 및 고찰

RAW 264.7에서 참치 심장 dichloromethane 분획물의 세포독성

참치 심장 70% 에탄올 추출물을 용매별(dichloromethane, ethyl acetate, butanol, water)로 분획한 결과, dichloromethane

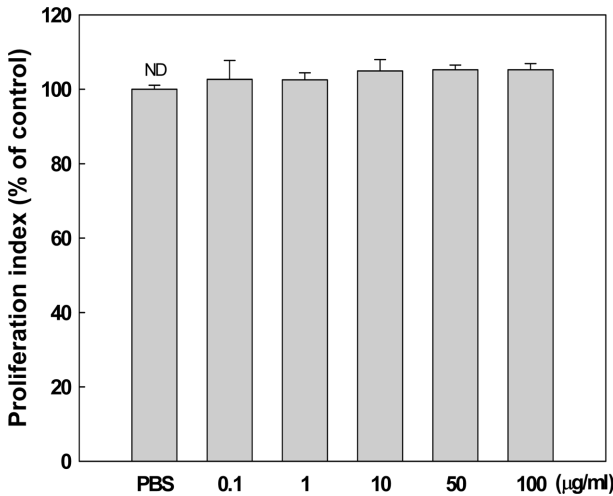


Fig. 1. Effect of dichloromethane fraction from skipjack tuna heart extract on the proliferation of RAW 264.7 cells. ND: not significantly different.

분획물이 다른 분획물에 비해 에탄올 추출물보다 전염증성 cytokine의 분비량 억제 효과가 높게 나타나 dichloromethane 분획물에 대해 in vivo와 in vitro 상에서 항염증 효과를 확인하였다(data not shown). 참치 심장 dichloromethane 분획물이 대식세포의 증식능에 미치는 영향을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포에 dichloromethane 분획물을 처리하여 세포 독성을 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 그 결과 세포의 생존율은 대조군(PBS 처리군)과 비교 시 모든 농도에서 유의적인 차이가 나타나지 않음을 관찰하였다(Fig. 1). 따라서, 참치 심장 dichloromethane 분획물은 0.1-100 µg/ml 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않아 독성이 없는 것으로 나타났다.

Dichloromethane 분획물의 NO 생성 억제 효과

NO는 염증 반응 시 면역세포의 합성 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 무기 유리체로 인체 내에서 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관 이완 등 여러 생물학적인 과정이나 피부손상 및 노화의 주요 원인이며 과도한 증가는 염증을 유발하고 조직의 손상을 유도하는 병적인 반응에서 중요한 물질이다[16]. 본 연구에서는 LPS에 의해 증가된 NO 분비량에 대해 참치심장 분획물이 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 2). LPS에 의해 증가된 NO 분비량은 참치 심장 70% ethanol 추출물과 dichloromethane 분획물을 각각 농도별로 처리하였을 때, 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 특히, dichloromethane 분획물은 100 µg/ml 농도로 처리하였을 때 약 63.8%로 NO 생성이 ethanol 추출물(28.2%) 보다 더 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따

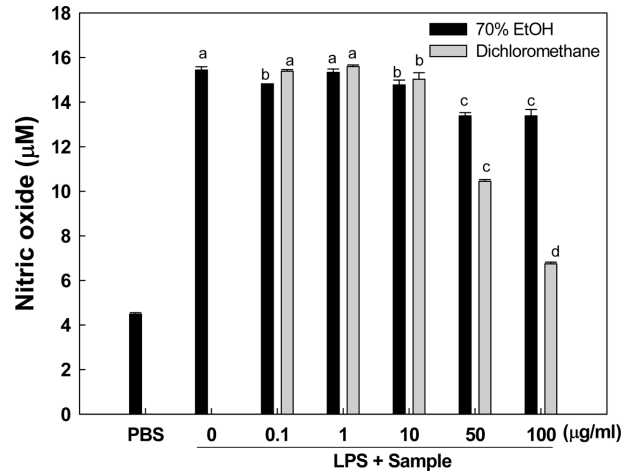


Fig. 2. Inhibitory effect of dichloromethane fraction from skipjack tuna heart extract on the production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

라서, dichloromethane 분획물이 NO 분비 억제에 효과가 좋은 것으로 나타나 항염증 효능을 가지는 유효성분이 다량 함유되어 있는 것으로 사료된다.

Dichloromethane 분획물의 pro-inflammatory cytokines 생성 억제 효과

대식세포의 toll-like receptor 4에 LPS가 결합하여 유도되는 pro-inflammatory cytokine으로 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 가 있다. 이런 cytokine들은 면역 반응을 일으키고 과도하게 생성되면 발열 및 조직을 손상시키고 염증반응을 촉진하게 된다[17]. 본 실험에서는 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 자극시켜 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 를 분비를 유도시킨 후 참치 심장 분획물의 억제 활성을 ELISA 방법을 통하여 측정하였다(Fig. 3). 그 결과, 전염증성 cytokine의 분비량은 LPS 처리에 의해 분비량이 증가하였으며, 참치 심장 에탄올 추출물 및 dichloromethane 분획물을 처리하였을 때 cytokine 분비량은 농도 의존적으로 감소되는 것으로 나타났다. IL-6의 분비량은 50 및 100 µg/ml 농도에서, dichloromethane 분획물은 42% 및 56%로 IL-6 분비량을 감소시켜, 70% ethanol 추출물(34%, 35%)보다 억제효과가 더 크게 나타났다. TNF- α 의 경우, dichloromethane 분획물과 70% ethanol 추출물 모두 농도 의존적으로 분비가 감소되었고, 70% ethanol 추출물이 효과가 조금 더 높은 것으로 나타났다. 100 µg/ml 농도에서는 각각 54% 및 61%의 감소효과를 나타내었다. IL-1 β 에서는 dichloromethane 분획물은 10-100 µg/ml 농도에서 약 56%의 감소효과를 나타내었고,

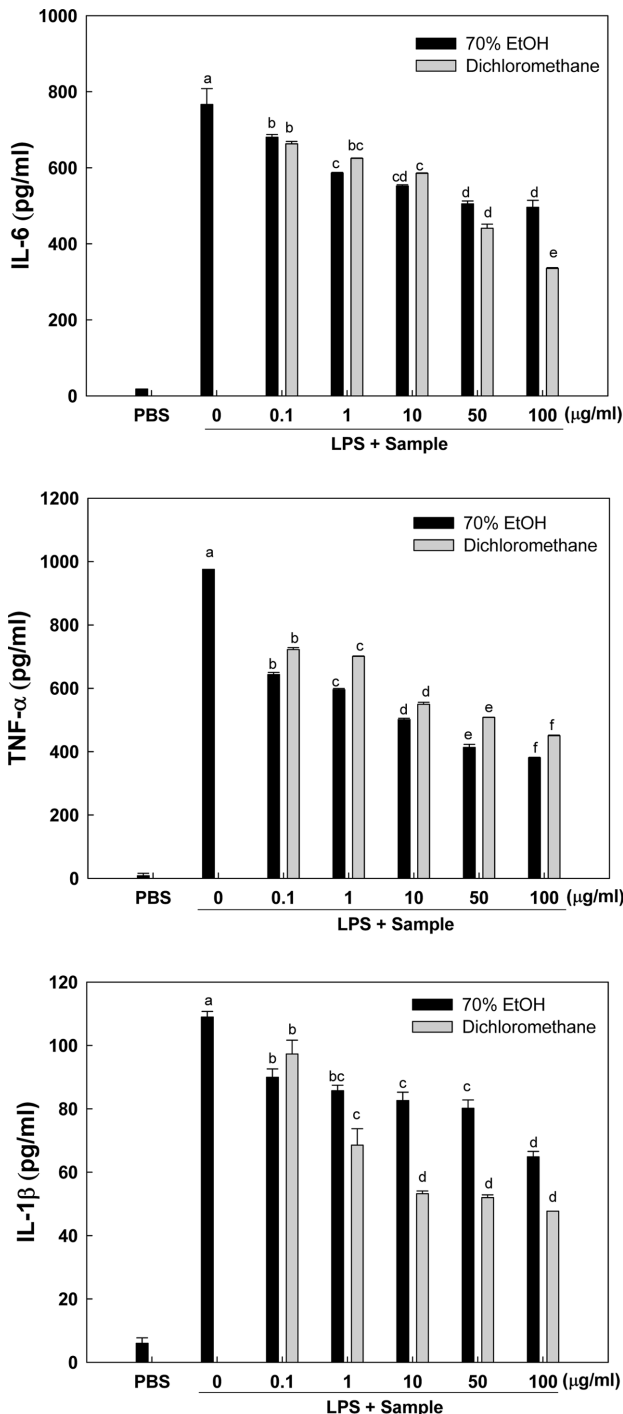


Fig. 3. Inhibitory effect of dichloromethane fraction from skipjack tuna heart extract on the production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 μ g/ml) alone or in combination with samples (0.1–100 μ g/ml) for 12 h. Means with different letters (a–f) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

70% 에탄올 추출물은 100 μ g/ml 농도에서 약 40%의 감소 효과를 나타내어 dichloromethane 분획물이 IL-1 β 분비량이 억제에 효과가 좋은 것으로 나타났다. 따라서 참치 심장 분획물 중 dichloromethane 분획물이 pro-inflammatory cytokine 분비량 억제를 통해 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

Dichloromethane 분획물의 iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65 발현 억제 효과

염증반응이 일어나게 되면 iNOS와 COX-2는 NO와 염증 매개 물질인 PGE₂를 분비시키게 되며 이로 인해 조직 및 신경 손상과 함께 부종 등의 염증 반응을 촉진시키게 된다[18]. 특히, NF- κ B는 iNOS와 COX-2의 발현을 조절하는 전사인자로서 염증반응 시 I κ B kinase가 활성화되어 I κ B로 유리되어 핵 내로 이동하여 iNOS, COX-2 그리고 pro-inflammatory cytokine의 발현을 촉진하게 된다[19]. 따라서 본 실험에서는 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 참치 심장 dichloromethane 분획물을 처리하였을 때 항염증 효과를 확인하였다. 그 결과(Fig. 4A, B), LPS의 처리에 의한 염증 매개 인자 (iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65)의 발현이 dichloromethane 분획물을 처리시, iNOS는 10–100 μ g/ml 농도에서 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 100 μ g/ml 농도에서 60% 이상의 발현이 감소되는 것으로 나타났다. COX-2의 경우, 50과 100 μ g/ml 농도에서 유의적인 발현량 감소를 나타내었지만, 발현량 감소 효과는 크지 않았다. NF- κ B p65의 발현량은 10–100 μ g/ml 농도에서 유의적인 감소효과를 나타내었고, 100 μ g/ml 농도에서 40% 이상의 발현량 감소를 나타내었다. 따라서, NO와 전염증성 cytokine의 분비량은 iNOS와 NF- κ B 발현 조절을 통해 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

Dichloromethane 분획물의 MAPKs 발현 억제 효과

Mitogen-activated protein kinase (MAPKs)는 다양한 유전자의 발현과 분화 및 세포 생존, 사멸과 염증 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다. ERK, JNK 및 p38와 같은 MAPKs는 염증반응에 있어서 인산화를 통해 신호전달을 함으로써 NF- κ B의 활성화에 중요한 역할을 한다[20]. 따라서 본 연구에서는 참치 심장 dichloromethane 분획물의 MAPKs (ERK, JNK 및 p-38)의 발현량 조절여부를 western blot을 통해 확인하였다(Fig. 5). LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서의 대조군에서는 ERK, JNK 그리고 p38의 인산화를 확인하였고, dichloromethane 분획물을 각 농도별로 처리한 실험군에서는 인산화된 p-38과 p-JNK의 발현이 농도 의존적으로 인산화가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 특히, LPS에 의해 증가된 인산화된 p-38의 발현량이 58% 및

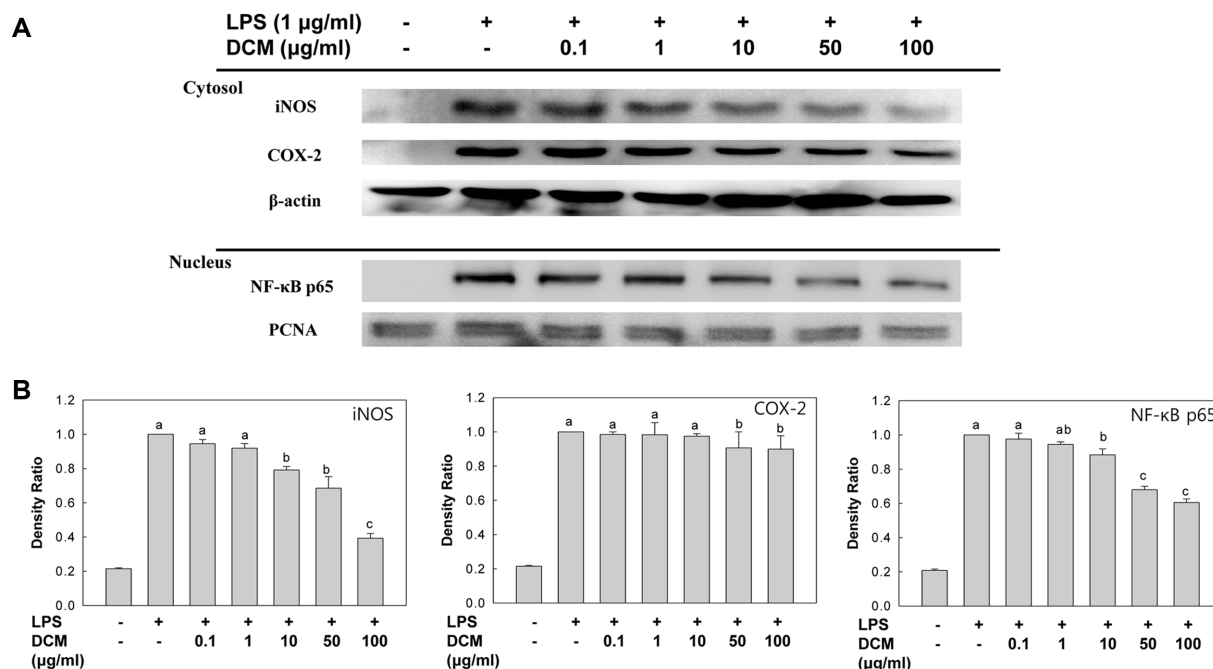


Fig. 4. Effect of dichloromethane fraction from skipjack tuna heart extract on iNOS, COX-2, and NF-κB p65 expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of iNOS, COX-2, in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF-κB in nuclear protein were determined by a western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of LPS (1 µg/ml) and dichloromethane fraction (DCM) for 18 h or 30 min and the proteins were detected using specific antibodies. Means with different letters (a–c) above the bars are significantly different by Duncan’s multiple range test ($p < 0.05$).

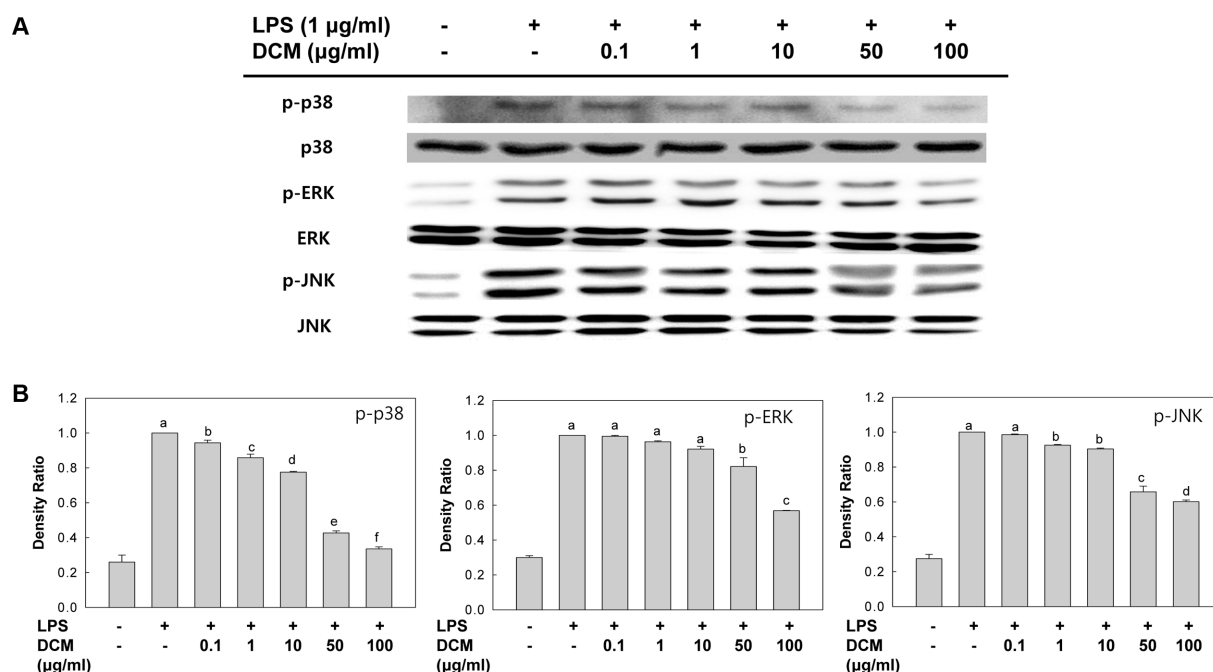


Fig. 5. Effect of dichloromethane fraction from skipjack tuna heart extract on phosphorylated MAPKs (p38, ERK, JNK) expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of phosphorylated p38, ERK, and JNK in the cytosolic protein were determined by a western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of LPS (1 µg/ml) and dichloromethane fraction (DCM) for 18 h or 30 min. Means with different letters (a–f) above the bars are significantly different by Duncan’s multiple range test ($p < 0.05$).

67% 정도 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5B). p-JNK의 경우, dichloromethane 분획물을 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리시, 35%와 40% 정도 발현량이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 반면, p-ERK의 경우, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의적인 발현량 감소를 나타내었으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 발현량 감소가 가장 크게 나타났다. 이를 통해, dichloromethane 분획물의 처리가 LPS에 의해 유도된 MAPKs와 NF- κB 의 인산화 억제 를 통해 전염증성 cytokine의 생성이 억제됨을 알 수 있다[21].

귀부종 억제 효과 및 조직 관찰

염증 발생시 인체 내에서는 생리학적 및 면역학적인 반응 등이 진행되며, 발열이 일어나면서 혈관 확장 및 부종 등의 생리 현상이 일어나게 된다. 또한, 면역세포인 mast cell이 염증반응에 의해 활성화 되면 여러 가지 pro-inflammatory 매개물질들의 분비를 유도한다. 따라서 염증반응에 의한 부종 완화 효과를 확인하기 위해 참치 심장 dichloromethane 분획물을 처리하여 실험을 진행하였다. 먼저, positive control로 사용된 합성 스테로이드제인 prednisolone은 10 및 50 mg/kg·body weight로 투여하였고, dichloromethane 분획물을 10, 50 및 250 mg/kg·body weight가 되도록 200 μl 씩 투여하였다. Croton oil로 귀 염증을 유발한 후, 각 농도로 sample을 투여하였을 때 control과 비교하여 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히, dichloromethane 분획물을 250 mg/kg·body weight 처리구와 positive control인 prednisolone을 50 mg/kg·body weight 처리구를 비교하였을 때, 유사하게 감소하는 것을 확인할 수

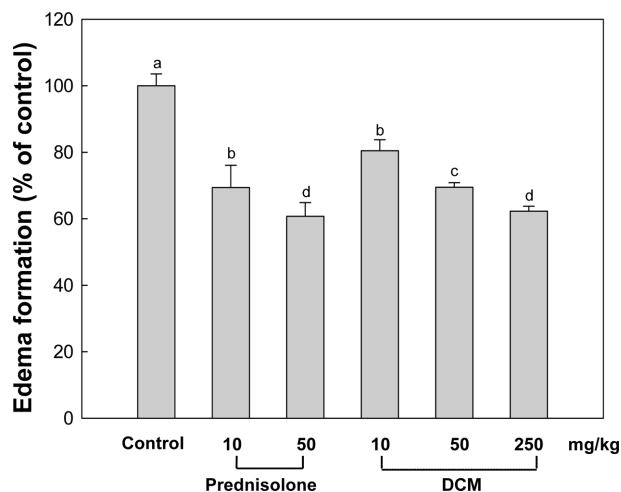


Fig. 6. Inhibition of dichloromethane fraction (DCM) from skipjack tuna heart ethanol extract on croton oil-induced mouse ear edema. Means with different letters (a–d) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

있었다(Fig. 6). Dichloromethane 분획물의 부종 억제 효과를 조직 관찰로 확인한 결과, control에서는 귀 조직의 경피 및 진피 두께가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, prednisolone과 dichloromethane 분획물을 처리한 경우에는 경피 및 진피 두께가 얇아진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7A). 조직 내 mast cell 침윤 정도를 확인하기 위해서, toluidine-blue 염색하여 확인하였다. 그 결과, croton oil을 처리하였을 때, mast cell 침윤이 많이 진행된 것을 확인할 수 있었지만, dichloromethane 분획물을 처리하였을 때, 조직내의 mast cell의 침윤을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7B). 이를 통해 dichloromethane 분획물이 염증을 예방하거나 치료하는 항염증제로 이용 가능성이 보여주었다.

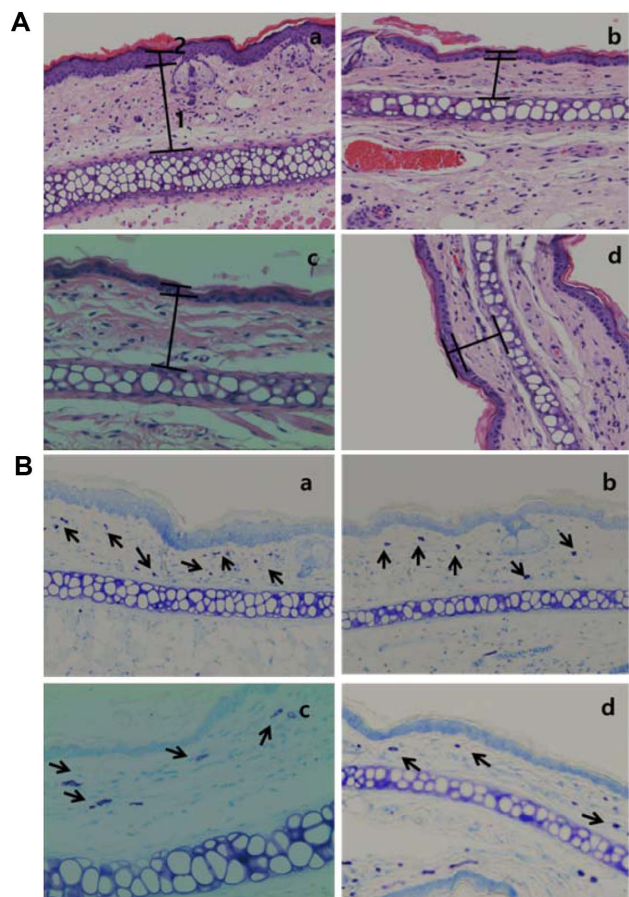


Fig. 7. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of Croton oil 5% (v/v) in acetone (a–c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) examined under light microscopy (magnification: 200 \times). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b) and dichloromethane fraction from skipjack tuna heart extract 20 μl /ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrows indicate mast cells.

요 약

본 실험에서는 참치 심장 70% ethanol 추출물을 dichloromethane으로 분획한 후 항염증 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS로 염증을 유도시켜 염증 매개성 물질인 NO와 pro-inflammatory cytokine의 분비량의 변화를 확인하였다. 그 결과, 참치 심장 dichloromethane 분획물을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NO의 생성량을 감소시키는 것을 확인하였으며, 특히, 100 µg/ml에서 가장 높은 억제효과를 나타내었다. 따라서 dichloromethane 분획물의 억제 활성이 세포사멸에 의한 감소인지 알아보기 위해서 MTT assay를 하였을 때, 세포 생존율이 dichloromethane 분획물을 PBS 처리군과 비교하였을 때 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인하였고, 이를 통해 dichloromethane 분획물이 NO 및 전염증성 cytokine의 분비를 효과적으로 억제할 수 있는 물질임을 확인할 수 있었다. Dichloromethane 분획물을 처리하였을 때, 염증 관련 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 확인한 결과, LPS에 의해 발현이 증가된 NF-κB, iNOS 및 COX-2는 분획물을 처리함으로써 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 dichloromethane 분획물의 처리가 인산화된 MAPKs의 발현을 저해함을 확인하여 참치 심장 dichloromethane 분획물이 NF-κB와 MAPKs의 발현을 억제시킴으로써 NO 및 pro-inflammatory cytokine의 분비량을 감소시킴을 확인할 수 있었다. 동물 모델에서는, dichloromethane 분획물을 처리하였을 때 croton oil에 의한 귀 부종이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였고, 특히, 250 mg/kg·body weight 농도로 투여시 시판 항염증제인 prednisolone을 50 mg/kg·body weight 농도로 투여한 그룹과 유사한 효과를 나타내었다. 조직학적 변화를 확인한 결과에서는, 진피와 경피의 두께가 감소하였으며 진피내 mast cell 침윤이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 참치 심장 dichloromethane 분획물이 효과적인 염증 예방 및 부종 완화를 위한 치료제로서 활용 가능성을 확인하였다.

Acknowledgments

This study was a part of the project entitled 'Functional materials and foods using fisheries by-products', funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Korea (20130279).

References

- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. 2007. Innate immunity, pp. 52-73. In: Tenney S (6th ed.), *Kuby Immunology* Freeman press, New York.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad.* **1**: 7773-7777.
- Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 723-737.
- Carter AB, Knudtson KL, Monick MM, Hunninghake GW. 1999. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-κB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J. Biol. Chem.* **274**: 30858-30863.
- Sung MJ, Davaatseren M, Kim W, Park SK, Kim SH, Hur HJ, et al. 2009. Vitisin A suppresses LPS-induced NO production by inhibiting ERK, p38, and NF-κB activation in RAW 264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.* **9**: 319-323.
- Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, et al. 2014. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**: 729-733.
- Kim KH, Choi MW, Lim SY. 2013. Effect of tuna extract on production of nitric oxide and inflammatory cytokines. *Korean J. Food Sci. Technol.* **45**: 385-390.
- Jang JR, Kim KK, Mun SB, Lim SY. 2009. In vitro anticancer and antioxidant effect of solvent extracts from tuna dried at low temperature vacuum. *J. Life Sci.* **19**: 633-638.
- Pedersen MH, Mølgaard C, Hellgren LI, Lauritzen L. 2010. Effects of fish oil supplementation on markers of the metabolic syndrome. *J. Pediatr.* **157**: 395-400.
- Tenore GG, Calabrese G, Ritieni A, Campiglia P, Gianetti D, Novellino E. 2014. Functional food potentially safer than commercial fish oil based pharmaceutical formulations. *Food Chem. Toxicol.* **71**: 231-235.
- Jung HS. 2007. Antioxidant effect of histidine containing low molecular weight peptide isolated from skipjack boiled extract. *Korean J. Food Cookery Sci.* **23**: 221-226.
- Park SE, Kim HW, Lee SR, Kim BK. 2000. Effects of nucleic acids complex of tuna testis on immunological activities. *J. Korean Assoc. Cancer Prev.* **5**: 15-23.
- Shin MO, Ku MJ, Bae SJ. 2007. Cytotoxicity and quinone reductase activity stimulating effects of fin of *Thunnus thynnus* extracts in various cancer cells. *Korean J. Nutr.* **40**: 147-153.
- 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-κB in RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 985-990.
- Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW. 2000. Induction of nitric oxide and TNF-α by herbal plant extract in mouse macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 342-348.
- Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* **569**: 321-326.
- Han MH, Lee MH, Hong SH, Choi YH, Moon JS, Song MK, et al. 2014. Comparison of anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and

- Dictamnus dasycarpus* and their mixtures in RAW 264.7 murine macrophages. *Korean J. Life Sci.* **24**: 329-335.
18. Lim HR, Shin SW. 2010. Effects of the essential oil components from *Ligusticum chuanxiong* on proinflammatory mediators of RAW 264.7 macrophage cells. *Korean Sci. Pharm.* **16**: 259-264.
 19. Pruett SB, Fan R, Zheng Q. 2003. Characterization of glucocorticoid receptor translocation, cytoplasmic I κ B, nuclear NF κ B, and activation of NF κ B in T lymphocytes exposed to stress-inducible concentrations of corticosterone in vivo. *Int. Immunopharmacol.* **3**: 1-16.
 20. Robinson MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 180-186.
 21. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH, et al. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by prepenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 617-620.