

## 펩티도글리칸 처리된 갯지렁이 추출물의 항염증 및 항산화 효과

김세웅 · 샵코타마헤쉬 · 양명 · 이양 · 소윤조\*

전북대학교 치과대학 치과약리학교실

### Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Clam Worm Extract Treated with Peptidoglycan

Se-woong Kim, Mahesh Sapkota, Ming Yang, Liang Li and Yunjo Soh\*

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeon-ju 561-756, Republic of Korea

**Abstract** – Peptidoglycan in inserts and mammals is well known to improve biological functions in the host's immune system. However, it is unclear how Peptidoglycan exerted its anti-inflammatory capacity especially in clam worm (*Marphysa sanguinea*). In this experiment, the anti-inflammatory and antioxidant effects of clam worm extract treated with (PCWE) peptidoglycan (*Micrococcus luteus*) in RAW264.7 cells were examined by measuring MDA, catalase, SOD, GSH-Px and inflammatory cytokines (nitric oxide, iNOS, interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ ). PCWE significantly increased the activities of catalase, SOD and GSH-Px and decreased the level of MDA. Interestingly, PCWE induced activities of SOD and GSH-Px more than clam worm extract without peptidoglycan (CWE). In addition, PCWE decreased NO production, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  better than CWE. Taken together, these results indicate that PCWE has the potential as a natural antioxidant and a therapeutic for inflammation-related diseases.

**Keywords** – Peptidoglycan, Clam worm extract, Anti-inflammation, Antioxidant

갯지렁이(clam worm)는 동양의학에서 수백 년 전부터 한방의학에 사용되어 왔다. 갯지렁이의 생태환경은 지속적인 외부 요인의 자극을 받는 극한 상황이며 갯벌에서 생존은 감염(infections), 외부 침입(intruding neighbors), 포식자(repel predators) 등으로부터 생존하기 위해 생체 내 특이적 생리활성 메커니즘을 가지고 있다. 최근 Pan<sup>1)</sup> 등의 보고에서 갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis grube*)에서 항균펩타이드(Antimicrobial peptides)인 Perinerin을 보고하였으며, 다른 종의 갯지렁이(*Pichia oastoris*)에서도 perinerin이 확인되었다.<sup>2)</sup> 항균펩타이드는 해양생물 및 곤충, 무척추동물 등에서 많이 분포하고 있으며, 그 생리활성은 세균 감염에 대한 면역 반응으로 자가면역(innate immunity) 및 비자기인식(microbial non-self recognition)을 통해 인식된다. 펩티도글리칸(Peptidoglycan)은 세균의 세포벽의 성분으로 비자기인식에 중요하게 작용하며 펩티도글리칸 인식 단백질(peptidoglycan recognition proteins)에 의해 인식되어, 채액

성(soluble CD14)와 세포성(Toll-like receptor2)의 활성을 통해 대식세포가 활성화 되어 감염에 대한 치료 물질을 생산한다.<sup>3-5)</sup> 또한 곤충에서 펩티도글리칸의 생체 내 반응 펩티도글리칸 인식단백질 PGLYRP2는 펩티도글리칸의 아미다제 가분해 활성(hydrolytic amidase activity)을 통해 활성화되는 염증을 억제하여 외부로부터 오는 감염이나 자극에 대한 항염증 효과를 가지고 있다고 보고하였다.<sup>6-8)</sup> 그러나 갯지렁이에 존재하는 항균펩타이드는 많은 보고가 있었지만 아직까지 외부인자 및 펩티도글리칸에 의한 항산화, 항염증성에 대한 연구는 거의 보고된바 없다.

일반적으로 펩티도글리칸의 염증성 유발은 Lipopolysaccharides(LPS), Lipoteichoic acid(LTA) 및 Peptidoglycan 과 같은 외인성 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) 및 괴사된 세포에서 유리되는 단백질 및 핵산과 같은 damage-associated molecular patterns(DAMPs), 그리고 T helper 1(Th1) cell에서 분비되는 cytokine인 interferon (IFN)- $\gamma$ 에 의한 자극에 의해서 유도된다.<sup>9)</sup> Peptidoglycan에 의한 염증성 유발은 고전적 활성화(classically activated) 형태인 M1 표현형으로 대식세포를 변화시킴으로써, 염증촉

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

진성(pro-inflammatory) cytokines[tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), leukotrienes] 및 매개체인 nitric oxide(NO)의 세포 내 급증 초래하여 염증을 유발하는 특성을 가진다.<sup>9-11)</sup> 또한 염증에 의해 superoxide radical의 세포 내 급증이 발생되지만 세포내 방어기작으로 항산화효소(Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase)에 의해 제거되나<sup>12)</sup> 이를 초과한 과량의 활성산소종(Reactive oxygen species; ROS)으로 인한 산화적 스트레스가 발생되어 염증기간 동안에 조직 손상을 직접 초래할 수 있다고 보고되었다.<sup>13,14)</sup> 이와 반대로 Peptidoglycan에 의한 염증억제 작용은 IL-4 및 IL-13과 같은 Th2 cytokines<sup>15)</sup>와 glucocorticoids 및 resolvins과 같은 항염증성 및 염증해소성 자극에 의해 염증억제 특성을 가지고 있는 대식세포의 M2 표현형으로의 변형을 유도하여 항염증 작용을 한다.<sup>16-18)</sup> M2 대식세포는 IL-10과 같은 항염증성 cytokine을 분비하고 염증반응부산물들의 소거에 관련된 CD36의 발현이 증가하게 되고, 그에 따라 상처의 회복 및 조직의 리모델링과 같은 항상성을 유지하는데 작용함으로써 염증을 해소하는데 주된 역할을 한다. 따라서 NO의 생성이나 iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 발현 억제와 염증에 의한 활성산소종의 억제는 염증질환을 치료하는데 있어서 중요한 목표가 된다.

본 연구에서는 펩티도글리칸 처리된 갯지렁이 추출물을 이용하여 펩티도글리칸에 의해 유도된 염증 및 산화 스트레스에 대한 방어작용으로 항산화, 항염증성이 유도될 수 있는지를 검토하기 위해 펩티도글리칸 처리 유무에 따라 갯지렁이 추출물이 대식세포에서 LPS로 유도된 항염증 관련 인자 NO, iNOS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2를 억제할 수 있는 항염증성 효과와 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 갯지렁이는 블루오션피어(주)에서 판매하는 바위털갯지렁이(*Marphysa sanguinea*)를 구매하여 실험에 공시하였다. 바위털갯지렁이는 인하대학교의 홍재상교수가 검증한 후 실험에 사용 하였고 각각의 표준품은 전북대학교 치의학 전문대학원 치과약리학교실에 보관하였다.

**펩티도글리칸 처리** - 바위털갯지렁이에 펩티도글리칸 처리는 Kwon<sup>19)</sup> 등의 방법을 사용하였다. Kwon<sup>19)</sup> 등의 결과에서 펩티도글리칸(*Micrococcus luteus*, Sigma-Aldrich, Cat No. 53243)의 처리 시 가장 높은 항균활성을 나타내었으므로, 본 연구에서도 펩티도글리칸으로 *Micrococcus luteus* peptidoglycan을 구매하여 사용하였다. 바위털갯지렁이에 면역유도를 실시하기 위해 펩티도글리칸 10 mg을 PBS로 1000

배 희석하여 바위털갯지렁이의 3부위에 나눠 체강 내 100  $\mu$ l/마리(10 ppm) 주입하였다. 펩티도글리칸 처리된 바위털갯지렁이는 해수에서 10시간 항산화, 항염증 활성을 유도한 후 살아있는 바위털갯지렁이만 선별하여 실험실로 옮겼다.

**바위털갯지렁이 추출물 제조** - 펩티도글리칸 처리된 바위털갯지렁이 분말은 실험실에서 해수를 이용해 4-8회 세척을 통해 이물질을 제거 후 deep freezer에 24시간 보관 후 동결건조기(Ilshin Rab Co., Ltd.)를 사용하여 동결건조하였으며, 동결 건조된 바위털갯지렁이를 믹서를 이용하여 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 freezer 에서 24시간 보관 후 동결건조기를 이용하여 동결건조를 하였다. 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  $\mu$ 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 사용하였다. 항산화 분석에 사용되는 SOD kit는 trevigen(Gaithersburg, MD, USA), GSHPx kit는 Oxis International, Inc.(Forster, CA, USA)에서 구입해 사용하였다. 염증억제 관련 분석 시 사용되는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 ELISA kit는 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  $\mu$ g/ml streptomycin)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도 조건하에서 배양하였다. 대식세포는 염증을 유발하기 위해 LPS(2  $\mu$ g/ml)을 FBS가 없는 배양액에 첨가하여 염증을 유도하였으며, 바위털갯지렁이 추출물은 여러 농도를 첨가한 후 실험에 이용하였다.

**세포 생존율 측정** - RAW264.7 cell을 96 well plate에 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후, 갯지렁이를

농도별로 처리하여 후 PBS에서 세척 후 배양액에 100 µg/ml MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide]를 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 세포는 다시 PBS로 세척 후 200 µl DMSO를 첨가해 녹인 후 ELISA microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포의 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

**지질과산화 측정** - 지질과산화(lipid peroxidation)은 Prasad K<sup>20)</sup> 등의 방법을 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 ×g에서 10분 동안 원심분리 후 상층액은 1시간 동안 boiling water에서 0.67%(w/v) thiobarbituric acid 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 펩티도글리칸 처리 유무에 따라 처리된 추출물 및 처리되지 않은 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 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NaNO<sub>2</sub>의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 계산하였다.

**효소측정** - Catalase 활성은 Aebi<sup>21)</sup> 등의 방법을 사용하여 측정하였다. 반응은 최종 양이 1 ml이 되게 전체 세포 단백질 100 µg에 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.0) 850 µl, 19 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 1분 동안 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.

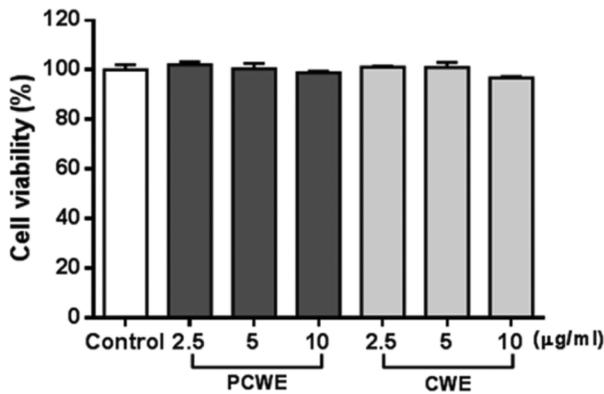
**Western Blot 분석** - 전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold PBS으로 3회 세척한 후, lysis buffer[20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF), 및 1×protease inhibitor cocktail]를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 16,000 ×g에서 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 40분간 세척한 다음, 2차항체와 반응시켰다. 이어서 ECL Plus kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)으로 반응시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 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 1×10<sup>6</sup> cells/well로 현탁하고, 펩티도글리칸 처리 유무에 따른 다양한 농도의 추출물을 전처리 하고 30분 뒤에 LPS(2 µg/ml)로 자극하여 24시간 배양하였다. 세포 상층액을 수집하여 TNF-α, IL-1β를 ELISA 방법으로 정량하였다.

**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

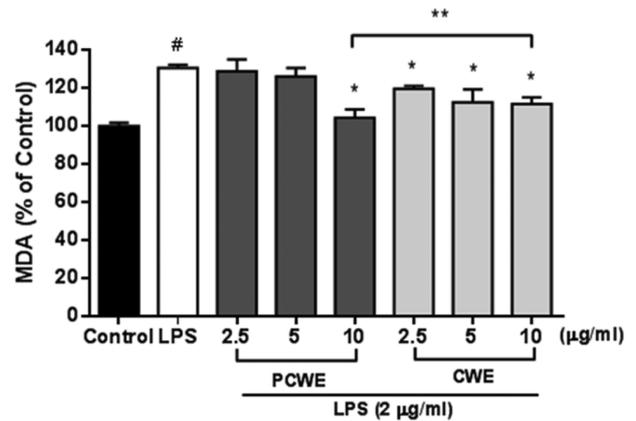
**펩티도글리칸 처리 유무에 따른 갯지렁이 추출물에 대한 세포 독성** - 펩티도글리칸 처리 유무에 따른 추출물의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT 분석 방법을 사용하여 생존율을 측정하였다. 각 처리 농도 2.5, 5 그리고 10 µg/ml에서 대조군과 비교하여 펩티도글리칸 처리된 추출물에서 세포 내 독성은 없는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 펩티도글리칸 처리에 따른 추출물의 세포 내 독성이 없는 것으로 판단되며, 이전 연구에서 지렁이와 두토막눈썹갯지렁이(*Perinereis lineae*) 추출물의 대식세포 세포주인 RAW264.7 cell에 대한 세포독성을 분석하였을 때에도 유사한 경향이



**Fig. 1.** Effects of clam worm extract treated with (PCWE) or without peptidoglycan (CWE) on RAW 264.7 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.

관찰되었다.<sup>22)</sup> 따라서 본 실험에서 펩티도글리칸 처리 유무에 따른 추출물의 적정 농도를 2.5, 5 그리고 10 µg/ml로 판단하여 실험을 진행하였다.

**펩티도글리칸 처리 유무에 따른 바위털갯지렁이 추출물에 대한 지질과산화 억제 효과** - 지질과산화는 외부의 강력한 자극이나 상처에 의해 발생되며, 특히 LPS의 처리에 의한 지질과산화의 증가는 세포 손상과 항산화 물질의 억제를 초래한다.<sup>23)</sup> 따라서 산화적 손상의 지표로서 free radical에 의해 생성되는 지질과산화물인 malondialdehyde(MDA)<sup>24)</sup>은 산화과정의 스트레스를 나타내주는 지표기 때문에 MDA 변화를 측정하여 산화적 스트레스 억제 효과를 측정하였다. LPS 처리 후 펩티도글리칸 처리 유무에 따른 갯지렁이 추출물의 MDA 억제 효과를 알아보기 위해 각각 2.5-10 µg/ml 농도를 처리하여 지질과산화 억제 효과를 검토하였다 (Fig. 2). 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물은 LPS 처리군



**Fig. 2.** Effects of clam worm extracts treated with (PCWE) or without (CWE) peptidoglycan 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. <sup>#</sup>*P*<0.05 as compared with the untreated group. <sup>\*</sup>*P*<0.05 as compared with the LPS treatment group. <sup>\*\*</sup>*P*<0.05 as compared with PCWE (10 µg/ml) and CWE (10 µg/ml) treatment group.

과 비교해 농도의존적으로 유의적 억제 효과를 나타내었다 (*P*<0.05). 그러나 펩티도글리칸 처리된 추출물에서는 단지 10 µg/ml 농도에서 유의적인 억제 효과를 나타냈다(*P*<0.05). 비록 펩티도글리칸 처리된 추출물에서 10 µg/ml 농도에서만 억제 효과를 나타냈지만 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물과 비교해 MDA 억제 효과가 유의적으로 더 높게 나타났다. 이 결과는 갯지렁이 추출물 자체로도 지질과산화 증가를 억제할 수 있으나 펩티도글리칸을 처리 시 더 높은 효과를 낼 수 있을 것으로 판단되며, 따라서 펩티도글리칸 처리된 추출물은 LPS에 의해 증가된 산화적 스트레스의 산물인 지질과산화의 생성을 억제시킬 수 있다고 판단된다.

**Table I.** Effects of clam worm extracts treated with (PCWE) or without (CWE) peptidoglycan on antioxidative enzyme activities in LPS-stimulated RAW264.7 cells

	Control	LPS (2 µg/ml)	LPS (2 µg/ml)					
			PCWE (µg/ml)			CWE (µg/ml)		
			2.5	5	10	2.5	5	10
Catalase (units/mg protein/min)	43.0±1.9	47.04±0.92 <sup>#</sup>	50.60±1.06 <sup>*</sup>	74.37±2.72 <sup>*</sup>	87.12±4.83 <sup>*</sup>	51.74±3.00	59.78±4.67 <sup>*</sup>	83.35±5.89 <sup>*</sup>
SOD (units/mg protein/min)	6.01±0.28	7.76±0.31 <sup>#</sup>	11.17±0.55 <sup>*</sup>	13.03±0.26 <sup>*</sup>	14.27±0.88 <sup>**</sup>	9.46±0.11	9.31±0.16	13.19±0.37 <sup>*</sup>
GSH-px (mU/ml protein)	32.82±0.76	33.94±0.30	33.03±0.51	38.35±0.33 <sup>*</sup>	45.84±0.42 <sup>**</sup>	33.78±0.95	37.90±0.48 <sup>*</sup>	43.79±1.09 <sup>*</sup>

Cells were pre-incubated with or without indicated concentrations of clam worm extracts treated with (PCWE) or without (CWE) peptidoglycan 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

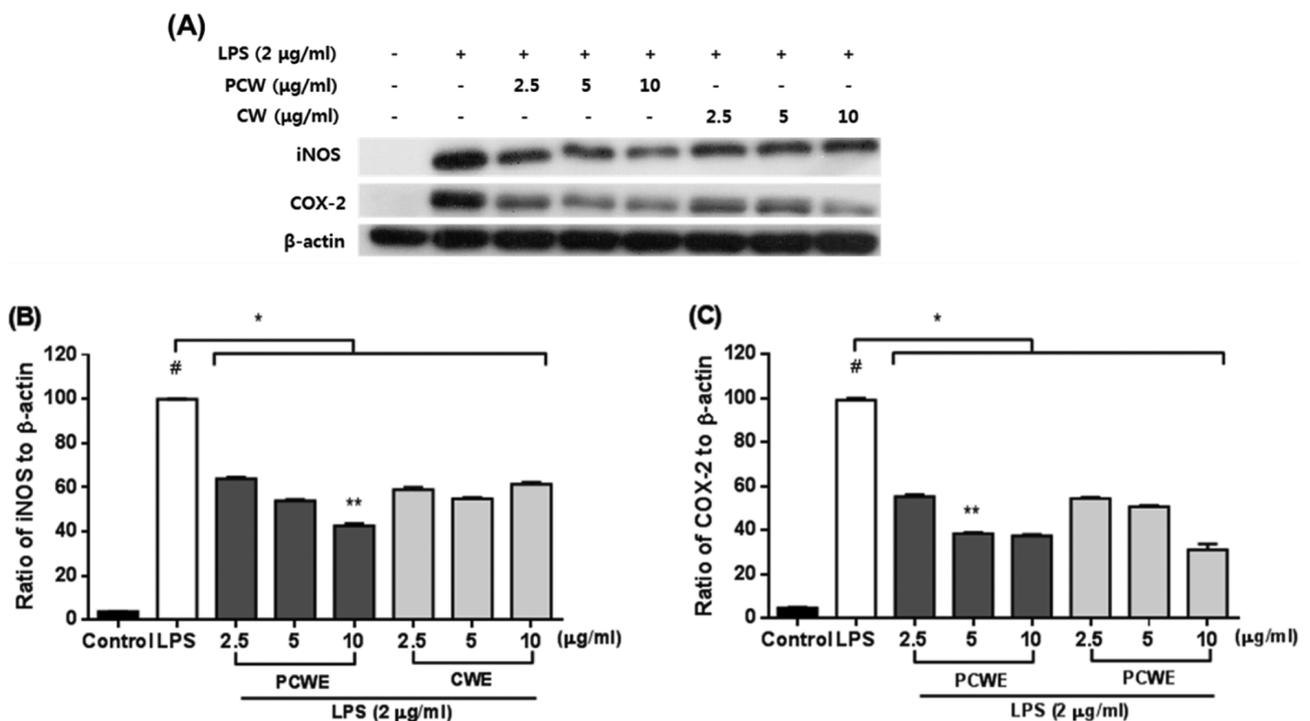
<sup>#</sup>*P*<0.05 as compared with the untreated group

<sup>\*</sup>*P*<0.05 as compared with the LPS treatment group

<sup>\*\*</sup>*P*<0.05 as compared with PCWE (10 µg/ml) and CWE (10 µg/ml) treatment group

펩티도글리칸 처리 유무에 따른 바위털갯지렁이 추출물  
에 대한 항산화 효소 활성효과 - 항산화 효소 활성 정도를  
측정하기 위해 LPS처리 후 펩티도글리칸 처리 유무에 따라  
추출물을 첨가하여 catalase, SOD 및 GSH-Px를 측정하였  
다(Table I). Catalase 활성은 LPS 처리구(47.04±0.92 units/  
mg)가 대조구(43.0±1.9 units/mg)에 비해 유의적으로 증가하  
였지만(P<0.05), 펩티도글리칸 처리된 추출물은 LPS 처리  
구와 비교해 2.5-10 µg/ml(50.60±1.06, 74.37±2.72, 87.12±  
4.83 units/mg) 농도에서 농도의존적으로 유의적 증가를 나  
타내었고(P<0.05), 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물의 경  
우 LPS 처리구와 비교해 5와 10 µg/ml(59.78±4.67, 83.35±  
5.89 units/mg) 농도에서 유의적으로 높은 활성도를 나타내  
었다(P<0.05). 비록 펩티도글리칸 처리 유무에 따른 catalase  
의 활성에는 유의적 차이를 나타내지 않았지만 10 µg/ml의  
농도에서 펩티도글리칸 처리된 추출물이 더 높은 catalase  
활성을 나타내었다. SOD 활성은 LPS 처리군(7.76±0.31  
units/mg)이 대조군(6.01±0.28 units/mg)에 비해 유의적으로  
증가하였지만(P<0.05), 펩티도글리칸 처리된 추출물에서 LPS  
처리군과 비교해 2.5-10 µg/ml(11.17±0.55, 13.03±0.26,  
14.27±0.88 units/mg) 농도에서 유의적으로 더 높은 활성도  
를 나타내었다(P<0.05). 그러나 펩티도글리칸 처리하지 않

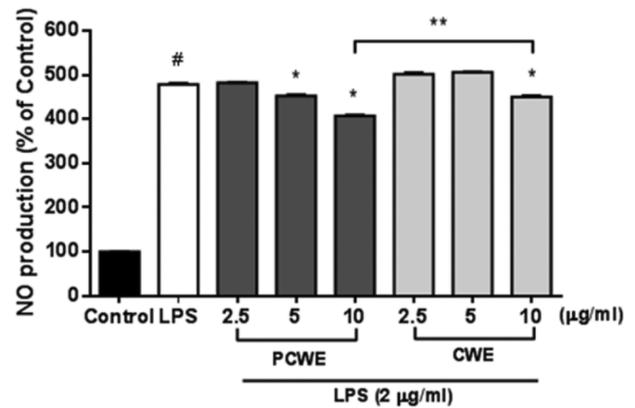
은 추출물은 LPS 처리군과 비교해 단지 10 µg/ml(13.19±  
0.37 units/mg) 농도에서 유의적으로 높은 활성도를 나타냈  
다(P<0.05). 특히 펩티도글리칸 처리된 추출물의 10 µg/ml  
의 농도에서는 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물과 비교  
해 유의적으로 더 높은 활성도를 나타내었다(P<0.05). 또한  
GSH-Px 활성은 대조구(32.82±0.76 mU/mg)와 LPS 처리구  
간(33.94±0.30 mU/mg)에 유의적인 차이가 없었으나, 펩티  
도글리칸 처리된 추출물에서 5와 10 µg/ml(38.35±0.33,  
45.84±0.42 mU/mg) 농도에서 LPS 처리구와 비교해 유의적  
으로 높은 활성도를 나타내었고(P<0.05), 펩티도글리칸 처  
리하지 않은 추출물에서도 5와 10 µg/ml(37.90±0.48, 43.79±  
1.09 mU/mg) 농도에서 LPS 처리군과 비교해 높은 활성도  
를 나타내었다. 하지만 펩티도글리칸 처리된 추출물의 10 µg/  
ml 농도에서는 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물과 비교  
시 유의적으로 더 높은 GSH-Px 활성을 나타냈다. 따라서  
이 결과는 비록 catalase에서는 펩티도글리칸 처리 유무에  
따른 유의적 차이가 나타나지 않았지만 다른 항산화 효소  
인 SOD와 GSH-Px 활성도를 검토한 결과 펩티도글리칸 처  
리된 추출물이 10 µg/ml에서는 활성이 더 높게 증가됨을 확  
인하였다. 그러므로 펩티도글리칸의 처리는 갯지렁이의 생  
체 활성을 증진 시켜 항산화효소의 생산을 촉진시킴으로써



**Fig. 3.** Effects of clam worm extracts treated with (PCWE) or without (CWE) peptidoglycan 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 pre-incubated with or without indicated concentrations of extract for 2 h, and 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 PCWE (10 µg/ml) and CWE (10 µg/ml) group.

산화스트레스에 대한 억제 효능을 가지고 있다고 판단되며 강력한 항산화제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

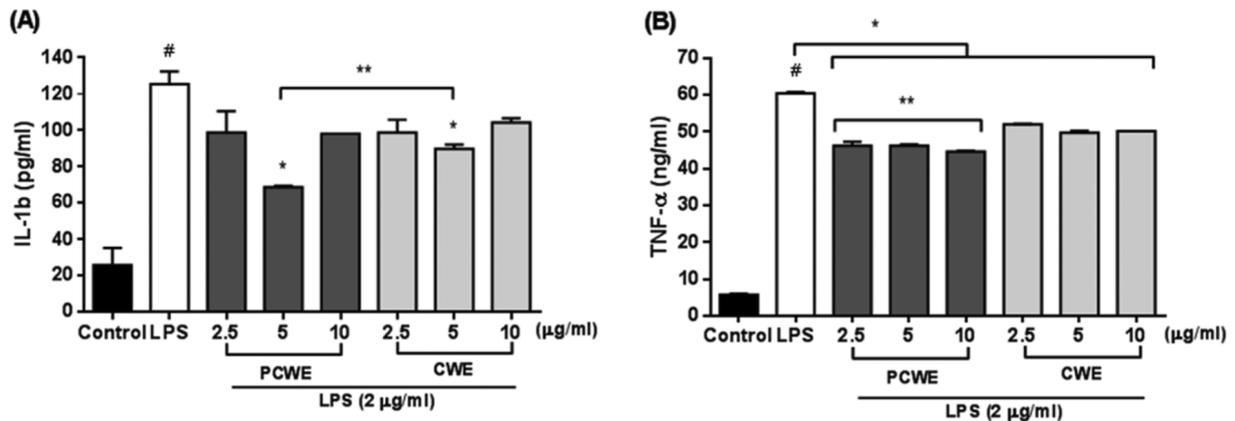
펩티도글리칸 처리 유무에 따른 갯지렁이 추출물의 LPS에 유도된 NO 생성과 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제에 미치는 효과 - iNOS의 증가에 의한 NO의 과도한 생성과 COX-2의 증가는 염증반응의 특징이다. 따라서 펩티도글리칸 처리 유무에 따른 추출물이 LPS에 의해 유도된 COX-2, iNOS와 NO의 발현에 미치는 영향을 알아보았다. LPS에 의해 유도된 iNOS의 억제 정도를 확인한 결과 LPS 처리 시 대조군과 비교해 (Fig. 3B, 3C) 10배 증가하였지만 펩티도글리칸 처리된 추출물은 2.5-10 µg/ml 농도에서 LPS에 의해 증가된 iNOS를 유의적으로 억제시켰고( $P < 0.05$ ), 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물에서도 2.5-10 µg/ml 농도에서 LPS 처리구와 비교 시 유의적인 억제 효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 하지만 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물의 경우 농도 증가에 따른 억제 효과가 증가되지 않고 오히려 10 µg/ml 농도에서는 iNOS 단백질 발현이 다소 증가됨을 확인하였다. 또한 펩티도글리칸 처리된 추출물에서는 10 µg/ml 농도에서 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물과 비교 시 유의적으로 더 높은 억제 효과를 나타냈다. COX-2의 경우 LPS 처리구에 비해 펩티도글리칸 처리된 추출물은 2.5-10 µg/ml 농도에서 유의적인 억제 효과를 나타내었고( $P < 0.05$ ), 펩티도글리칸 처리되지 않은 추출물에서도 2.5-10 µg/ml의 농도에서 유의적 억제 효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 특히 펩티도글리칸 처리된 추출물의 경우 5 µg/ml의 농도에서부터 펩티도글리칸을 처리하지 않은 추출물과 비교해 유의적으로 더 높은 억제 효과가 있음을 확인하였지만(Fig. 3A, 3B) 10 µg/ml 농도에서는 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물에서 다소 높은 억제 효과를 나타내었지만 유의적인 차이는 없었다. NO 생산 결과(Fig. 4)에서 LPS 처리구와 비교해 펩티도글리칸 처리된 추출물은 5와 10 µg/ml 농도에서 유의적으로 억제 효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 그러나 펩티도글리칸 처리하지 않은 추출물의 경우 단지 10 µg/ml 농도에서 유의적 억제 효과를 나타내었고( $P < 0.05$ ) 펩티도글리칸 처리된 추출물의 경우 처리되지 않은 추출물과 비교해 10 µg/ml의 농도에서 유의적으로 더 높은 억제 효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 따라서 펩티도글리칸 처리는 LPS에 의해 유도된 iNOS, NO 생산 및 COX-2를 10 µg/ml 농도에서 더 효과적으로 억제할 수 있다고 판단된다. 염증반응에 의한 iNOS, NO, 및 COX-2의 증가는 만성 염증질환을 야기하며<sup>25</sup> 염증인자의 억제는 염증관련 질병 치료에 중요하게 인식되고 있다. 특히 대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS)로 자극하면 iNOS(inducible nitric oxide synthase)가 발현되어 NO를 생성하게 되며 NO의 과량 생성은 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.<sup>26-28</sup> 또한 cyclooxygenase-2(COX-2)는 아라키돈산으로부터 염증매개 물질인 PGE2



**Fig. 4.** Effects of clam worm extracts treated with (PCWE) or without (CWE) peptidoglycan on nitrite production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Cells were pretreated with 2.5, 5, and 10 µg/ml clam worm extracts 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. <sup>#</sup> $P < 0.05$  as compared with the untreated group. <sup>\*</sup> $P < 0.05$  as compared with the LPS treatment group. <sup>\*\*</sup> $P < 0.05$  as compared with PCWE (10 µg/ml) and CWE (10 µg/ml) treatment group.

(prostaglandin E2) 생성을 촉매하는 효소로서 iNOS와 마찬가지로 염증반응에 중요한 역할을 한다. 본 연구결과에서 펩티도글리칸 처리된 갯지렁이 추출물은 COX-2 및 iNOS와 NO 생산에 대한 높은 억제 효과가 있음을 확인하였고, 특히 10 µg/ml의 농도에서 펩티도글리칸 처리되지 않은 추출물과 비교해 유의적으로 높은 COX-2 및 iNOS와 NO 생산에 대한 억제 효과를 나타내었다.

펩티도글리칸 처리 유무에 따른 갯지렁이 추출물의 LPS에 의해 유도된 IL-1β와 TNF-α의 억제에 미치는 효과 - IL-1β와 TNF-α는 염증반응에 의해 생산된다. 따라서 염증 억제 정도를 측정하기 위해 LPS 처리 후 펩티도글리칸 처리 유무에 따른 갯지렁이 추출물을 첨가하여 IL-1β와 TNF-α를 측정하였다. IL-1β의 결과(Fig. 5A)에서 펩티도글리칸 처리된 갯지렁이 추출물과 처리되지 않은 추출물에서 LPS 처리군과 비교해 5 µg/ml 농도에서 유의적으로 높은 억제 효과를 나타내었지만( $P < 0.05$ ), 2.5와 10 µg/ml 농도에서 유의적 차이가 나타나지 않았다. 하지만 펩티도글리칸 처리된 추출물에서 처리되지 않은 추출물과 비교해 5 µg/ml 농도에서 유의적으로 더 높은 억제 효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ). TNF-α의 결과(Fig. 5B)에서 LPS 처리군과 비교해 펩티도글리칸 처리 유무와 상관없이 TNF-α 억제 효과가 2-10 µg/ml 농도에서 유의적으로 높은 억제 효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 하지만 펩티도글리칸 처리된 추출물에서 처리되지 않은 추출물과 비교 시 2-10 µg/ml 농도에서 유의적으로 더 높은 억제 효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 따라서 펩티도글리칸 처리된 추출물은 처리되지 않은 추출물과 비교해 더



**Fig. 5.** Effects of clam worm extracts treated with (PCWE) or without (CWE) peptidoglycan 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. <sup>#</sup>*P*<0.05 as compared with the untreated group. <sup>\*</sup>*P*<0.05 as compared with the LPS treatment group. <sup>\*\*</sup>*P*<0.05 as compared with PCWE (10 μg/ml) and CWE (10 μg/ml) treatment group.

높은 염증억제 효능이 있다고 판단된다.

이 결과는 펩티도글리칸에 의해 갯지렁이 내 염증반응이 유도되면 갯지렁이 내 생체방어 시스템을 통해 염증억제 물질의 생성 또는 대식세포의 형질변형을 통해 염증을 억제할 수 있을 것으로 사료되며, 본 연구에 사용된 갯지렁이 추출물은 기존 극한 환경에서 생존을 위해 갯지렁이 가지고 있는 항염증성 물질을 펩티도글리칸 처리에 의해 더 활성화시킬 수 있다고 사료된다. 따라서 갯지렁이에서 특정 펩티도글리칸을 처리 시 염증억제 물질이 생성되며 이 물질은 일반적인 임상시험 전 동물실험을 통한 효과 검증 시에 사용되는 마우스 대식세포의 염증억제에도 탁월한 효과가 있으므로 사람을 대상으로 하는 항염증 제제로의 활용 가능성이 높을 것으로 판단된다. 따라서 추가적인 실험을 통해 갯지렁이의 항염증 물질에 대한 연구와 작용 메커니즘에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

### 결론

이상의 연구결과를 통하여 펩티도글리칸 처리된 추출물은 지질과산화 억제를 통해 항산화 물질인 Catalase, SOD, 및 GSH-px의 활성을 더 증가시켜 항산화제로서 탁월한 효과를 나타내었고, COX-2 억제 및 iNOS의 억제를 통한 NO 생산을 감소시키고 항염증 대사 물질인 IL-1β와 TNF-α의 억제를 통한 항염증 제제로서의 가능성을 나타내었다. 이 결과는 펩티도글리칸 처리가 갯지렁이 자체에 존재하는 항산화, 항염증성 물질의 생리활성을 더 증진시킬 수 있다고 판단되며 더 높은 염증억제 효능과 항산화 효과를 나타내어 염증과 관련된 질환 치료에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

### 사사

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

### 인용문헌

- Pan, W., Liu, X., Ge, F., Han, J. and Zheng, T. (2004) Perinerin, a novel antimicrobial peptide purified from the clamworm *Perinereis aihuhitensis* grube and its partial characterization. *J. Biochem.* **135**: 297-304.
- Zhou, Q., Li, M. and Xi, T. (2009) Cloning and expression of a clamworm antimicrobial peptide perinerin in *Pichia pastoris*. *Curr. Microbiol.* **58**: 384-388.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R. and Golenbock, D. (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**: 1-5.
- Dziarski, R., Ulmer, A. J. and Gupta, D. (2000) Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chem. Immunol.* **74**: 83-107.
- Wang, J. E., Jørgensen, P. F., Almlöf, M., Thiemermann, C., Foster, S. J., Aasen, A. O. and Solberg R. (2000) Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect. Immun.* **68**: 3965-3970.
- Mellroth, P., Karlsson, J. and Steiner, H. (2003) A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 7059-7064.

7. Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M. S., Blanot, D., Oh, B. H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D. and Lemaitre, B. (2006) The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* **24**: 463-473.
8. Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I. G., Hoffmann, J. A. and Royet, J. (2006) Down regulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog.* **2**: e14.
9. Kurata, S. (2004) Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by peptidoglycan recognition protein (PGRP)-family members in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* **28**: 89-95.
10. Mosser, D. M. (2003) The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc Biol.* **73**: 209-212.
11. Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., van Rooijen, N., Crawford, M., Colville-Nash, P., Farrow, S. and Gilroy, D. W. (2008) Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* **112**: 4117-4127.
12. 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.
13. 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 $\kappa$ B kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cells* **16**: 97-105.
14. 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.
15. Zhang, S., Shen, Z., Hu, G., Liu, R. and Zhang, X. (2009) Effects of endogenous glucocorticoids on allergic inflammation and T(H)1/T(H)2 balance in airway allergic disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **103**: 525-534.
16. Chinetti-Gbaguidi, G., Colin, S. and Staels, B. (2015) Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**: 10-17.
17. Chang, H. Y., Lee, H. N., Kim, W. and Surh, Y. J. (2015) Docosahexaenoic acid induces M2 macrophage polarization through peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation. *Life Sci.* **120**: 39-47.
18. Titos, E., Rius, B., González-Pérez, A., López-Vicario, C., Morán-Salvador, E., Martínez-Clemente, M., Arroyo, V. and Clària, J. (2011) Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J. Immunol.* **187**: 5408-5418.
19. Kwon, M. G., Seo, J. S., Youn, H. J., Park, C. I., Jeong, J. M. and Bae, J. S. (2016) Effect of the polychaete antimicrobial peptide as feed additives on olive flounder and black rockfish. immune activity. *JFMSE* **28**: 1640-1650.
20. 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.
21. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121-126.
22. Kim, S. W., Sapkota, M., Li, L., Yang, M., Park, C. I. and Soh, Y. (2016) Anti-inflammatory and antioxidant effects of clam worm extract in macrophage RAW264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **47**: 150-157.
23. 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.
24. Tagesson, C., Kallberg, M. and Wingren, G. (1996) Urinary malondialdehyde and 8-hydroxydeoxyguanosine as potential markers of oxidative stress in industrial art glass workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **69**: 5-13.
25. Cooper, E. L. (2004) Complementary and alternative medicine, when rigorous, can be science. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **1**: 1-4.
26. 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**: 273-277.
27. 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.
28. Chiou, W. F., Chou, C. J. and Chen, C. F. (2001) Campothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW264.7 macrophages. *Life Sci.* **69**: 625-635.

(2017. 7. 21 접수; 2017. 8. 21 심사; 2017. 9. 5 게재확정)