

## 염증성 피부질환 개선 기능 소재로서 동근전복(*Haliotis discus*) 유래 항균펩타이드 Ab4-7의 항염증 효과

최수철<sup>1</sup> · 서정길<sup>2,\*</sup> · 황준호<sup>\*\*</sup> · 이기영<sup>3,\*\*\*</sup> · 이인아<sup>4,†</sup>

<sup>1</sup>군산대학교 자연과학대학 화학과, 박사과정학생

<sup>2,\*</sup>군산대학교 해양과학대학 식품생명과학부, 부교수

<sup>\*\*</sup>(주)제주사랑농수산

<sup>3,\*\*\*</sup>군산대학교 해양과학대학 해양생명응용과학부, 교수

<sup>4</sup>군산대학교 자연과학대학 화학과, 부교수

(2020년 4월 8일 접수, 2020년 5월 22일 수정, 2020년 6월 5일 채택)

### Anti-inflammatory Effects of *Haliotis discus*-derived Antibacterial Peptide (AMP) Ab4-7 as a Functional material for Improving Inflammatory Skin Diseases

Soo-Cheol Choi, Jung-Kil Seo\*, Joon-Ho Hwang\*\*, Ki-Young Lee\*\*\*, and In-Ah Lee†

Department of Chemistry, College of Natural Science, Kunsan National University, Jellabuk-do 54150, Korea

\*Department of Food Science and Biotechnology, College of Natural Science, Kunsan National University

\*\*Jeju Love Co. Ltd

\*\*\*Department of Marine Biotechnology, Kunsan National University

(Received April 8, 2020; Revised May 22, 2020; Accepted June 5, 2020)

**요약:** 서해안에 서식하는 해양생물인 전복은 항산화 및 항염증 효과가 있으며, 항생제 개발 및 화장품 원료 등 다양한 산업에 활용될 수 있는 잠재력을 가진 자원이다. 본 연구에서 우리는 서해안의 다양한 해양 생물 중에서 전복을 선택하였으며, 전복에서 분리한 항균펩타이드(AMP)를 이용하여 항균펩타이드 유도체인 Ab4-7를 규명하고 생리활성을 연구하였다. Ab4-7의 항염증 효능을 확인하기 위해 염증이 유도된 RAW 264.7에 Ab4-7를 처리한 결과, 염증성 사이토카인, TLR4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS 등을 억제하고 항산화와 관련된 유전자인 HO-1의 mRNA 발현을 증가시켰다. Ab4-7의 강력한 항산화 및 항염증 효과를 바탕으로, 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 Ab4-7이 extracellular matrix metalloproteinase (ECM) 분해에 관여하여 다양한 염증성 피부질환을 유도하는 유전자인 matrix metalloproteinase (MMPs)를 조절하는 효과를 RT-PCR을 통해 확인하였다. Ab4-7은 강력한 항염증 및 항산화 효과를 가지고 있으며, 항염증 및 항산화 효과를 통한 MMPs 관련 유전인자 조절을 통해 다양한 염증성 피부질환 치료제의 기능성 재료로 활용될 수 있다고 사료된다.

**Abstract:** Abalone, a marine organism inhabiting the west coast of Korea, has antioxidant and anti-inflammatory effects, and is a resource with potential to be used in various industries such as antibiotic development and cosmetic raw materials. In this study, we chose abalone among various marine lives on the west coast. Antibacterial peptide (AMP) was separated from abalone and its derivative Ab4-7 was identified and its physiological activity was studied. The treatment of Ab4-7 in inflammatory RAW 264.7 to check the anti-inflammatory efficacy inhibited inflammatory cytokines, TLR4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, and iNOS and increased mRNA manifestation of HO-1, genes related to antioxidants. Based on the

† 주 저자 (e-mail: leeinah@kunsan.ac.kr)  
call: 063-469-4574

strong antioxidant and anti-inflammatory effects of Ab4-7, the effects of Ab4-7 in the inflammatory RAW 264.7 cells were identified through RT-PCR, which regulates the gene Matrix Metalloproteinase (MMPs) that induces a variety of inflammatory skin diseases by engaging in the decomposition of the extracellular matrix metalloproteinase (ECM). Taken together, it is concluded that Ab4-7 has a powerful anti-inflammatory and antioxidant effect and can be used as a functional material for various inflammatory skin disease treatments by controlling the genes associated with matrix metalloproteinase (MMPs).

**Keywords:** *Haliotis discus*, antibacterial peptide Ab4-7, inflammatory skin diseases, matrix metalloproteinases, anti-inflammatory

## 1. 서 론

염증 반응이란 여러 가지 형태의 감염 또는 자극을 통해 신체 내로 침투한 외부의 항원 및 생체 내 대사산물 중 자극성 물질에 대한 내부의 불필요한 요소를 제거하기 위하여, 모든 조직에 다양한 형태로 분포하고 있는 대식세포 (macrophage)뿐만 아니라 세포매개면역이나 선천면역체계에서 제거작용과 함께 회복 및 수복작용이 동시에 이루어지는 중요한 염증 반응이다[1-3].

염증에 의해 일어나는 염증성 피부질환 중에는 접촉피부염(contact dermatitis)이 가장 흔하게 발생하는데 접촉피부염은 lipopolysaccharide (LPS)나 allergen과 같은 항원, 온도변화, 신경 자극, 자외선 등과 같은 자극성 물질이나 환경이 피부에 접촉하고 피부를 통해 침투하여, 면역세포가 생체의 이물질 등을 인식하여 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 많은 염증 매개인자들을 분비함으로써 시작된다[4-7].

염증 반응에 관여하는 다양한 인자들 중 nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B (NF-κB)는 염증 반응에서 중심적 위치를 차지하는 핵심인자로서, IL-1α, IL-1β, IL-6 등의 인터루킨들(interleukins, ILs), MMP-1, MMP-2 등의 Matrix Metalloproteinase (MMPs)의 발현 및 nitric oxide (NO), prostaglandins E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 합성 촉진 등의 조절에 관여하는 것으로 알려진 전사인자(transcription factor)로 염증 반응 조절에 관여한다[8-13].

NF-κB에 유도된 다양한 cytokines은 면역 세포를 자가 활성화시키거나 다른 면역 세포들을 활성화시켜 활성화된 세포에서 cytokine (IL-1α, IL-1β, IL-6)과 chemokine (COX-2) 등의 생리 활성 물질들을 분비하여 pro-inflammatory state가 반복해서 나타나 염증 반응을 지속한다. 지속적인 염증 반응은 만성 염증으로 변하여 P38 및 c-Jun N-terminal kinases (JNK)를 거쳐 미토콘드리아(mitochondria)의 기능부전을 일으킬 수 있으며, 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의

발생량을 증가시켜 세포 내 스트레스를 유발하는 과정을 통해 염증을 유발하거나, 세포와 조직에 직접적인 손상을 초래하여 퇴행성 질환, 심혈관계 질환 그리고 만성 염증성 피부질환 등의 질병과 관련되어 있다고 알려져 염증의 조절 기전을 다루는 연구가 활발하게 이루어지고 있다[2,14].

항균펩타이드는 생물의 선천 면역(innate immunity) 작용을 담당하는 천연 항균 물질로서, 다양한 미생물에 대해서 항균력을 가지고 있으며, 감염 억제 및 전신 면역반응을 유도하는 특성을 지닌 12 ~ 100 개의 아미노산으로 구성된 저분자 펩타이드 물질이다. 이들은 양친매성의 alpha-helix 또는 beta-sheet 구조를 지니고 있으며 항균펩타이드의 양이온 부위와 미생물 세포막의 음이온성 인지질과의 이온결합과 항균펩타이드의 소수성 부위와 인지질의 소수성 꼬리부분과의 소수성 상호작용을 통해서 세포막과의 비특이적 결합을 통해서 항균작용을 나타낸다. 특히, 항균 펩타이드는 세포막을 주요 target site로 삼아 병원체의 세포막을 빠르게 파괴해 내성균의 유발을 막고 외부로부터의 감염에 대한 가능한 효소 시스템(enzyme system)을 갖추고 있어 강력한 항염증 효과를 지닌 차세대 항생제 물질로 주목을 받고 있다. 천연 물질 유래의 항균펩타이드는 주로 곤충을 포함한 육상 생물이 주가 되어 연구가 진행되어 왔으며, 현재 존재하는 생물 유래 의약품 중 25% 이상이 육상 생물로부터 유래된 것으로 알려져 있다. 반면, 해양생물의 경우, 지난 30 년간 많은 연구가 진행되었지만, 생리활성물질로써 갯지렁이, 군소, 게, 홍합, 굴 등 육상·식물에 비해 현저히 적은 숫자로 아직까지 연구가 많이 부족한 실정이다[15-17].

전복(*Haliotis discus*)은 복족류(Archaeogastropoda)에 속하는 해양생물로 우리나라 전 연안에 분포되어 있으며, 비타민 B1 및 B2가 많고 칼슘, 인 등의 단백질, 미네랄, 타우린이 풍부한 해산물로 눈을 맑게 하고 피로 회복, 자양강장 등의 효과가 있다고 알려져 있다[18,19]. 최근 전복의 보편

화와 함께 건강식품으로 알려지면서 전복에 대해 활발한 연구가 진행되고 있지만, 성분 분석 차원에서의 기초적인 연구만 진행되었을 뿐, 항균펩타이드에 관련된 연구는 거의 진행되어 있지 않아 전복의 host defense mechanism을 이해하고, 선천 면역 요소들간의 상호연관성 연구를 통한 전복 유래 항균펩타이드에 관한 연구가 절실히 필요한 상황이다[20-22]. 따라서 본 연구에서는 항균펩타이드 디자인을 위한 모체 펩타이드(parent peptide)로서 참굴(*Crassostrea gigas*) 아가미에서 유래된 항균펩타이드인 cgMolluscidin과 높은 아미노산 서열의 유사성을 가지고 있으며[23], 전복(Hd)의 아가미에서 정제된 46 개의 아미노산으로 구성된 항균펩타이드(hdMolluscidin)를 사용하였다[24]. hdMolluscidin의 중앙에 위치하고 있는  $\alpha$ -helix 구조 부위를 토대로하여 아미노산의 치환, 첨가, 제거 및 C-말단을 amide화 시켜, 10 개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 Ab4-7를 디자인하였으며, 이 펩타이드를 활성화된 대식 세포주 RAW 264.7 세포에서 Ab4-7를 처리하여, 항산화 및 항염증 효과를 측정하고 항산화 및 항염증 효과를 통한 염증성 피부질환 치료제의 기능성 재료로서 활용 가능성에 대해 연구하였다.

## 2. 실험 조건 및 방법

### 2.1. 항균펩타이드(Ab4-7)의 디자인

hdMolluscidin를 모체(parent)로 한 유도체를 디자인하기 위해서 hdMolluscidin의 2 차 구조 예측을 Expsy tools (<https://www.expsy.org/tools/>)의 GOR 프로그램을 사용하였다[23-24]. 그 결과, 예측된 hdMolluscidin의 2 차 구조에서  $\alpha$ -helix 구조를 나타내는 2 곳 중에서 hdMolluscidin의 중앙에 위치한  $\alpha$ -helix 구조 부분을 선택하여 유도체 디자인에 활용하였다. 디자인된 유도체는 특정 위치에서 아미노산들이 첨가, 치환 및 제거가 되었으며, C-말단은 amid화 되었다[25]. 전복 아가미에서 정제된 항균펩타이드 Ab4-7은 hdMolluscidin의 center region으로부터 디자인된 펩타이드로 10 개의 아미노산(KWLLKLLXXL-NH<sub>2</sub>)으로 구성된 분자량 1281 Da의 basic (pI 10.48)한 성질을 가진 펩타이드로 디자인하였고 디자인된 펩타이드는 펩트론(주) (Kroea)에서 순도 95% 이상으로 합성 및 정제되어 최종적으로 0.01% 초산에 1000  $\mu$ g/mL의 농도로 녹여 이후의 실험에 사용되었다.

### 2.2. 시약 및 기기

Fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotic, Dulbecco's

modified eagle's medium (DMEM), Trypsin-ethylene-diamine-tetraacetic acid (Trypsin-EDTA) 등의 세포 배양용 시약들은 Life technologies (USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포 배양에 사용된 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator는 MCO-230AIC (Panasonic, Japan)을 사용하였다. 실험에 사용된 시약 중 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), lipopolysaccharide (LPS), crystal violet, formalin, methanol은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2.3. 피부유해균에 대한 Ab4-7의 생육 저해한 측정

실험에 사용된 균주는 피부유해균 3 종 (세균 2 종: *S. epidermidis*, *C. acnes*, yeast 1 종: *C. albicans*)을 사용하였다. 항균활성 측정 방법으로는 서로 다른 농도를 포함한 두 층의 배지를 사용하는 ultrasensitive radial diffusion assay (URDA)법을 이용하였다. URDA에 사용된 *S. epidermidis*, *C. albicans*는 우선 각각의 배지 및 배양 온도에서 18 h 동안 pre-culture 후 colorimeter (Product No.52-1210, BioMerieux, Inc., USA)를 사용하여 균 농도를 84%T(= 1 x 10<sup>8</sup> CFU/mL)가 되게 맞추었다. *C. acnes*은 RCM 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspak system (BBL Gaspak 100TM, USA)을 이용하여 밀봉한 후 37 °C에서 3 일 동안 혐기배양한 후에 동일한 방법으로 균농도를 맞추었다. 그 후, 9.5 mL의 0.03% tryptic soy broth (TSB), sabouraud's detrose broth (SDB), reinforced clostridial medium (RCM), 1% Type I agarose 및 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)를 포함하는 underlay gel에 각각의 농도로 희석된 균액 0.5 mL을 넣고 잘 섞은 후에 plate에 편평하게 부어 굳혔다. 굳은 plate에 punch를 사용하여 직경 2.5 mm의 well을 뚫은 후에 5  $\mu$ L의 각 추출물 및 정제 단계의 sample을 도입시켰다. 모든 sample은 0.01% acetic acid 5  $\mu$ L를 사용하여 용매에 의한 영향이 없음을 확인하였다. Sample이 배지에 스며들면 3 h 동안 1 차 배양한 후, 그 위에 10 mL의 6% TSB, SDB, RCM, 1% Type I agarose 및 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)를 포함하는 overlay gel을 붓고 굳힌 후에 동일한 온도에서 18 h (*S. epidermidis*, *C. albicans*) 또는 72 h (*C. acnes*, 위와 동일 조건으로 혐기배양) 동안 2 차 배양하였다. 배양 후 well 주위에 생긴 clear zone의 크기를 측정하여 항균활성을 확인하였다. 측정 후, clearing zone diameter에서 well diameter (2.5 mm)을 가감한 후에 최소효과농도(minimum effective concentration, MEC,  $\mu$ g/mL)를 계산하였다[26].

#### 2.4. 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB 40071, Korea)에서 분양 받아 사용하였으며, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic (10 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin)이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

#### 2.5. 세포 생존율 측정

세포 생존도를 알아보기 위하여 crystal violet assay를 이용하였다. RAW 264.7 세포를 1 x 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 24 well plate에 분주하고, 24 h 동안 전 배양 후 추출물을 농도별 (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL)로 첨가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양하였다. 배양 후, 각 well의 media를 제거하고, 1 x PBS 1 mL로 3 회 세척 후, 10% formalin 용액을 각 well에 200 µL씩 첨가하여 10 min 고정하였다. 고정을 마치면 20% methanol 이용해 제조한 1% crystal violet 200 µL을 각 well에 분주한 다음 상온에서 10 min 염색하였다. 염색이 끝나면 각 well에서 염색 용액을 제거하고 증류수로 6 번 세척 한다. 33% glacial acetic acid 용액을 각 well에 250 µL씩 가하여 20 배 희석한 용액을 96 well plate로 옮겨 염색된 세포의 흡광도를 microreader기를 이용해 595 nm에서 측정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{sample 흡광도}}{\text{control 흡광도}} \times 100$$

#### 2.6. Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

NO 생성량은 Griess 시약을 이용한 nitrite/nitrate assay kit (GOMA BIO, Korea)을 통해 세포 배양액 내 존재하는 NO의 안정된 산화물인 NO<sub>2</sub>를 측정하여 분석하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 2 x 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 접종하여 24 h 배양한 뒤 배지를 버리고 PBS로 세척한 다음 FBS를 포함하지 않는 새로운 배지로 교환하였다. 세포에 1 µg/mL의 LPS와 추출물을 농도별 (0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 24 h 재배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 상층액 100 µL와 griess 시약 100 µL을 혼합하여 96 well plate에서 10 min 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)의 농도별 표준 곡선과 비교하여 산출하였다.

#### 2.7. Total RNA 추출

총 RNA는 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 TRIzol (Sigma, USA)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 추

출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate water (DEPC)에 용해 시켜 역전사 중합 효소 연쇄반응을 수행하였다.

#### 2.8. 역전사 중합 효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

PCR은 DNA polymerase, buffer, dNTP, tracking dye가 포함된 RT-PCR kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 mRNA로부터 cDNA를 합성한 후, toll-like receptor 4 (TLR4), tumor necrosis factor-α (TNF-α), cyclooxygenase-2 (COX-2), 그리고 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 등 각각의 유전자에 해당하는 primer를 사용하여 94 °C 30 s, 55 ~ 62 °C 30 s, 72 °C에서 1 min, 총 35 cycles 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR product는 1.5% agarose gel 상에서 전기영동 하여 UV transilluminator로 확인하였다. 정량적 비교를 위하여 beta-actin으로 표준화하여 나타내었다. 분석에 사용된 각각의 primer 염기서열은 다음의 Table 1에서 나타내었다.

**Table 1.** Sequences of Target Gene-Specific Primers Used in the RT-PCR

Target gene	Description of clinical observation
HO-1	F : 5' - ATGGGTCTCAACCCCCAGC - 3' R : 5' - GCTCTTACGCTTCCAGGAAGTC - 3'
iNOS	F : 5' - CGGTGCTGTATTTCCCTACGAGGCGAAGAAGG - 3' R : 5' - GGTGCTGCTGTAGGAGGCAAGTAAAGGGC - 3'
COX-2	F : 5' - TTGAAGACCAGGAGTACCGC - 3' R : 5' - GGTACAGTCCCATGACATCG - 3'
IL-1β	F : 5' - AGCCATGGCAGAAGTACCT - 3' R : 5' - CAGCTCTCTTTAGGAAGACAC - 3'
IL-6	F : 5' - GTGTTGCCTGCTGCCTTCCCTG - 3' R : 5' - CTCTAGGTATACCTCAAACCTCAA - 3'
TNF-α	F : 5' - TTGACCTCAGCGCTGAGTTG - 3' R : 5' - CCTGTAGCCCACGTCGTAGC - 3'
TLR4	F : 5' - CAAAATCCCCGACAACCTCC - 3' R : 5' - TGTAGAACCCGCAAGTCTGTGC - 3'
MMP-9	F : 5' - CATCCGGCACCTCTATGGTC - 3' R : 5' - CATCGTCCACCGACTCAAA - 3'
MMP-12	F : 5' - ACCAGAGCCACACTATCCC - 3' R : 5' - CTCCTGCCTCACATCATACC - 3'
TIMP-1	F : 5' - TGCTGGGTGGTAACTCTTTATTTC - 3' R : 5' - ATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGATAG - 3'
beta-actin	5' - GGATTCCTATGTGGGCGACGA - 3' 5' - CGCTCGGTGAGGATCTTCATG - 3'

2.9. 인체 첩포시험

인체 첩포시험은 헬싱키 선언에 근거한 윤리규정[27] 및 식품의약품안전처 화장품 인체적용시험가이드라인[28]에 따라 실시되었으며, Frosch & Kligman이 고안한 방법[29]을 응용하여 특정 피부질환 및 알레르기가 없는 20 ~ 60 세의 건강한 성인을 대상으로 모집하였고 연구결과를 산업적으로 활용을 고려하였을 때 화장품산업에서의 이용을 중점으로 생각하여 피부에 개선에 관심이 높은 여성 피험자 32 명(평균연령 41.34 ± 8.06 세)을 대상으로 실시하였다(IRB 승인번호: 제1-220777-A-N-02호-DICN20005). 먼저, 첩포 부위인 등 부위를 70% ethanol로 소독한 후 시험물질 Ab4-7이 20 μL가 적용된 patch test chamber (Van der Bend, Netherlands)를 첩포 하였다. 48 h 후 첩포를 제거하고 skin marker (chemotechnique diagnostics AB, Sweden)로 시험 부위를 표시하였으며, 20 min, 24 h 후에 각 시험 부위를 평가하였다. 평가 기준은 Table 2에 제시한 PCPC guidelines의 판정 기준에 따랐으며, 2 회에 걸쳐 평가한 피부 반응은 다음 식을 통해 평균 반응도를 계산하였다.

$$Response = \frac{\sum (Grade \times No. \text{ of Responders})}{4 (Maximum \text{ Grade}) \times n (Total \text{ Subjects})} \times 100 \times 1/2$$

Table 2. Grading System for Skin Primary Irritation Test

Grade	Description of clinical observation
+1	Silght erythema
+2	Moderate erythema, possibly with barely perceptible edema at the margin, papules may be present
+3	Moderate erythema, with generalized edema
+4	Severe erythema with severe edema, with or without vesicles
+5	Severe reaction spread beyond the area of the patch

2.10. 통계 분석

인체 첩포 시험을 제외한 모든 실험은 5 회 이상 반복 실험하였으며, 실험에 대한 평균 ± 표준편차 (mean ± SD) 로 나타내었다. 통계학적 분석은 SPSS version (IBM, USA) 를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행하여 p < 0.05인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

3. 결 과

3.1. 피부유해균에 대한 Ab4-7의 항균성

피부유해균 3종 (세균 2종: *S. epidermidis*, *C. acnes*, yeast 1종: *C. albicans*)을 선정하고 disk paper method에 의하여 Ab4-7의 항균력을 검정한 결과를 Table 3에 나타내었다.

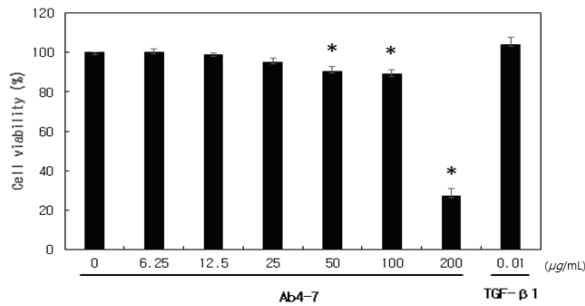
*S. epidermidis*, *C. acnes* 및 *C. albicans* 균주에 대한 Ab4-7의 항균력 test 결과, 다양한 농도 (31.3, 62.5, 125, 250, 500 그리고 1000 μg/mL)의 Ab4-7에서 농도 의존적으로 clear zone이 증가함에 따라, Ab4-7이 다음과 같은 3종의 피부유해균에 대하여 강력한 항균 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 또한, 3종의 피부유해균 모두에서 최소 농도 31.3 μg/mL에서도 clear zone을 형성하고 있어 Ab4-7이 적은 농도로도 강력한 항균 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, minimum effective concentration (MEC)를 구해 본 결과, *S. epidermidis* 균에서는 13.0 μg/mL, *C. acnes* 균에서는 14.0 μg/mL 그리고 *C. albicans* 균에서는 21.0 μg/mL의 MEC 값을 구할 수 있었다(Table 3).

이러한 결과는 Ab4-7이 3종의 피부유해균에 강력한 항균 활성을 가짐으로써, 여드름에 의한 피부질환 개선에 효과적인 천연 여드름 치료제제로서의 가능성을 시사한다.

Table 3. Measurement of Antibacterial Activity through Clear Zone Size at Ab4-7 Using Disk Paper Method

	Peptide concentration (μg/mL)						MEC (μg/mL)
	1000	500	250	125	62.5	31.3	
<i>S. epidermidis</i>							13.0 μg/mL
<i>C. acnes</i>							14.0 μg/mL
<i>C. albicans</i>							21.0 μg/mL

\*MEC: minimum effective concentration (μg/mL) (최소효과농도)



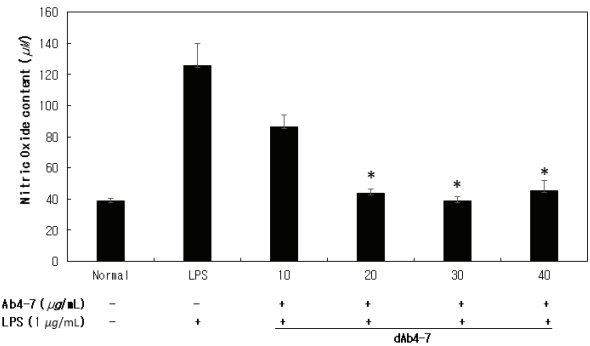
**Figure 1.** Cell viability of Ab4-7 was determined by crystal violet assay using RAW 264.7 macrophages. The data are expressed as % of solvent control (Mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.05, Ab4-7 vs. TGF- $\beta$ 1 group).

### 3.2. Cell Viability (%)

Ab4-7의 항염증 효과 규명에 앞서 mouse 유래 대식세포인 RAW 264.7에 대한 독성과 유효용량의 범위를 확인하기 위하여 crystal violet assay를 수행하였다. 항균펩타이드를 농도 별(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL)로 희석한 sample을 RAW 264.7 세포에 24 h 동안 처리한 후 세포 생존율을 확인한 결과 Figure 1에 나타난 바와 같이 12.5  $\mu$ g/mL 농도의 Ab4-7을 처리한 군에서 비 처리군과 비슷한 세포 생존율을 보였으며, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도에서 약간의 독성은 보였으며, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 급격한 세포 사멸을 일으켜 독성이 있음을 확인하였고, 이후 모든 실험은 50  $\mu$ g/mL 미만 농도에서 설정하여 진행하였다(Figure 1). 양성대조군으로는 0.01  $\mu$ g/mL 농도의 TGF- $\beta$ 1을 선정하여 실험에 사용하였다.

### 3.3. Ab4-7의 NO 생성량

그람음성균의 내독소(endotoxin)로 알려진 LPS를 대식세포에 처리하면, NO 염증성 cytokine과 같은 물질들이 생성되어 염증 반응을 조절하는 병리학적인 반응이 일어난다[30]. 염증 반응에서 NO는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 생성되는 것으로, 정상 상태에서는 방어작용과 신경전달 및 혈관 조절의 기능을 하지만, 고농도의 NO 생성은 peroxynitrite, nitrogen dioxide와 같은 유해물질을 생성하여 DNA를 손상시키고 세포 내 유해 산화물질의 축적으로 인해 만성 염증으로 인한 다양한 질병 및 염증성 피부 질환을 초래한다. 따라서, 본 연구에서는 Ab4-7의 항염증 효과를 검토하고자, RAW 264.7 세포에 LPS (1  $\mu$ g/mL) 또는 다양한 농도 (10, 20, 30 그리고 40  $\mu$ g/mL)의 Ab4-7을 처리하여 24 h 배양 후, 세포 내 NO 생성량을 Griess 시약을

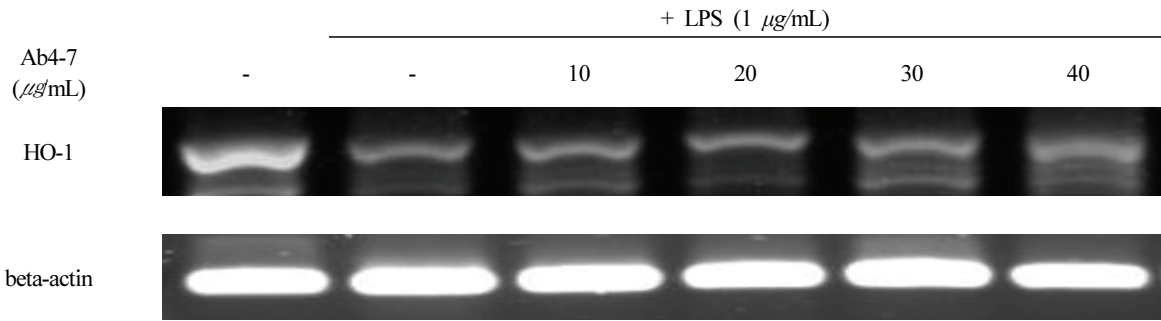


**Figure 2.** Effect of Ab4-7 on nitric oxide (NO) production of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (10, 20, 30 and 40  $\mu$ g/mL) of Ab4-7 and LPS (1  $\mu$ g/mL) and then incubated for 24 h. Nitrite levels in the culture media were determined using the Griess reagent and were presumed to reflect the levels of NO. The values shown are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$  < 0.05 vs. the LPS-induced group.

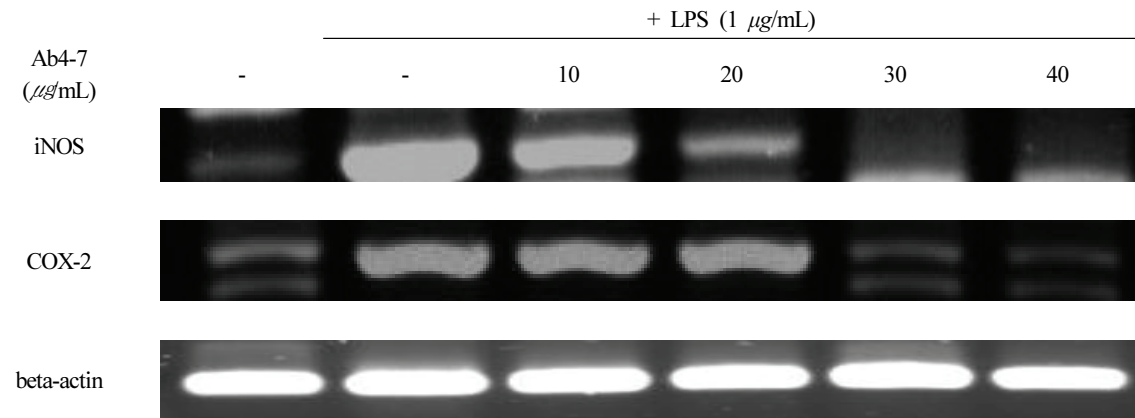
이용해 측정하였다. NO 생성은 LPS 염증 유도 군에서 강력하게 증가하였으며, Ab4-7 10, 20 그리고 30  $\mu$ g/mL 처리 군에서 농도 의존적으로 NO 생성 억제하였으며, 40  $\mu$ g/mL 처리 군에서 30  $\mu$ g/mL 처리 군 대비 약간 증가하는 경향을 나타냈다(Figure 2).

### 3.4. Ab4-7의 HO-1 mRNA 발현에 미치는 영향

Heme oxygenase-1 (HO-1)은 지질의 과산화, 단백질 산화, RNA/DNA 손상 등에 방어 작용을 하는 유전자로 산화적 스트레스에 의한 세포 손상에 대해 저항성을 제공하여 HO-1의 유도는 산화적 스트레스에 대한 조직의 보호 작용을 한다고 알려져 있다. 또한, Heme-HO-1 system의 산물인 biliverdin이 부종의 형성, 백혈구의 흡착과 이동 그리고 IL-6와 IL-1 $\beta$  같은 pro-inflammatory cytokines의 생성을 감소시킬 뿐만 아니라, CO와 biliverdin 같은 HO-1의 heme 분해에 따른 catabolic 산물들이나 HO-1에 의한 signal transduction pathway의 조절은 COX의 활성 및 그 발현과 NO 생성의 억제를 통해 염증 반응을 조절할 수 있다고 알려져 있다[31]. Ab4-7의 HO-1 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 RT-PCR을 진행한 결과, HO-1 mRNA 발현이 LPS 염증 유도 군에서 감소 되었으며, 농도별(10, 20, 30 그리고 40  $\mu$ g/mL)로 분주한 Ab4-7 처리 군에서 농도 의존적으로 HO-1 mRNA 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3).



**Figure 3.** Effect of Ab4-7 on the mRNA of HO-1 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g/mL}$ ) of Ab4-7 or LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. Total RNA was isolated and quantified by beta-actin for quantitative comparison and expressed as a comparative graph, and the level of mRNA expression of HO-1 were measured by RT-PCR.



**Figure 4.** Effect of Ab4-7 on the mRNA of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g/mL}$ ) of Ab4-7 or LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. Total RNA was isolated and quantified by beta-actin for quantitative comparison and expressed as a comparative graph, and the level of mRNA expression of iNOS and COX-2 were measured by RT-PCR.

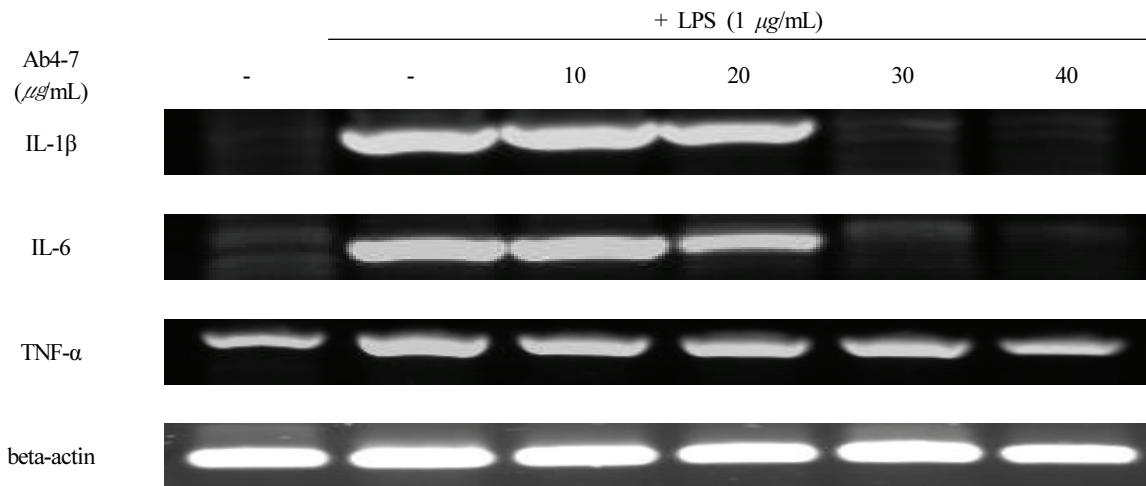
3.5. Ab4-7이 iNOS와 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향

LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 Ab4-7의 효과를 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. iNOS 및 COX-2 mRNA 발현은 LPS 염증 유도 군에서 강력하게 증가 되었으며, 농도별(10, 20, 30 그리고 40  $\mu\text{g/mL}$ )로 분주한 Ab4-7 처리된 군에서 농도 의존적으로 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

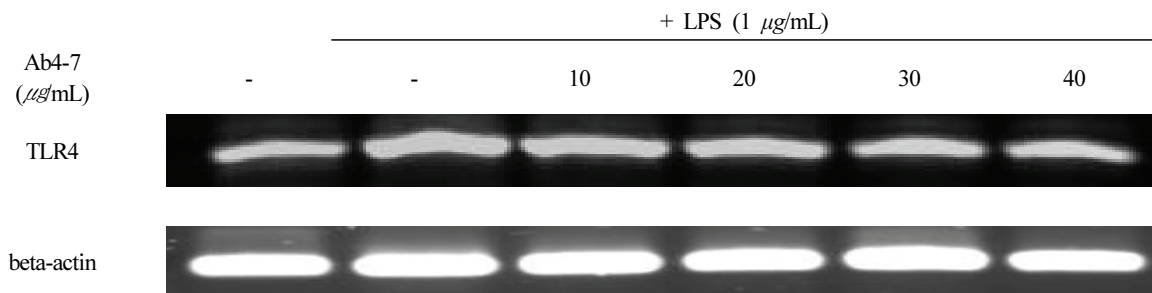
3.6. Ab4-7이 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 영향

IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포가 분비하는 주요한 염증성 사이토카인으로 알려져 있다. IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF-

$\alpha$ 은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 대식세포의 표면의 수용체인 toll-like receptor 4 (TLR4)가 이를 인식하고 활성화 하는 염증 매개물질로, 발열, 부종, 발적, 통증 등의 염증 반응을 일으킨다고 알려져 있어[32-33], IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$  발현에 대한 Ab4-7의 효과를 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 이를 위해 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에 Ab4-7을 농도별 (10, 20, 30 및 40  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리하여 24 h 배양하였다. 그 결과, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 LPS 염증 유도 군에서 강력하게 증가되었으며, Ab4-7 처리 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다(Figure 5).



**Figure 5.** Effect of Ab4-7 on the mRNA of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g/mL}$ ) of Ab4-7 or LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. Total RNA was isolated and quantified by beta-actin for quantitative comparison and expressed as a comparative graph, and the level of mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured by RT-PCR.



**Figure 6.** Effect of Ab4-7 on the mRNA of TLR4 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g/mL}$ ) of Ab4-7 or LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. Total RNA was isolated and quantified by beta-actin for quantitative comparison and expressed as a comparative graph, and the level of mRNA expression of TLR4 was measured by RT-PCR.

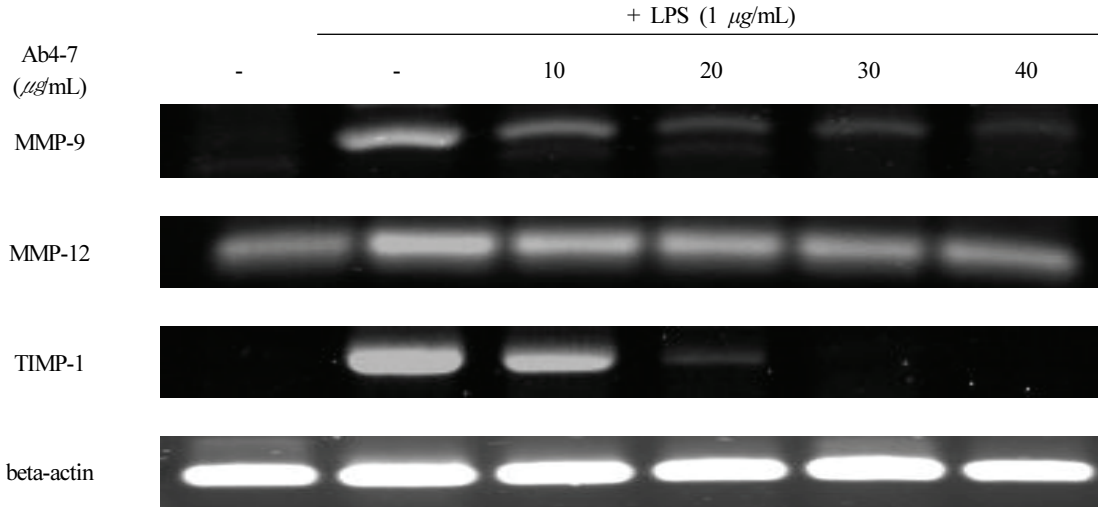
### 3.7. Ab4-7이 TLR4 생성에 미치는 영향

Toll-like receptor 4 (TLR4)는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 LPS를 인식하고 염증 매개물질을 활성화하는 대식세포 표면의 수용체로 TLR4 발현에 대한 Ab4-7의 효과를 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 이를 위해 RAW 264.7 세포에 LPS 및 Ab4-7을 농도별 (10, 20, 30 및 40  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리하여 24 h 배양하였다. 그 결과, TLR4 mRNA 발현은 LPS 염증 유도 군에서 강력하게 증가 되었으며, Ab4-7 처리 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다(Figure 6).

### 3.8. Ab4-7이 MMP-9, MMP-12 및 TIMP-10에 미치는 영향

Matrixins라고도 명명하는 MMPs는 세포성장인자, 호르몬 및 cytokines 등에 의해 전사 조절되며, ECM의 분해 과정을 시기적절하게 수행하여 배발생, 형태형성, 생식 및 조직의 흡수와 재형성에 필수적인 요소이다. 하지만 다양한 생체 내 원인에 의해 내인성 억제자인 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)와의 불균형은 과도한 MMPs의 증가로 이어져 피부 조직의 손상을 통한 염증성 피부질환을 일으킬 수 있다고 알려져있어[8-13], MMP-9, MMP-12 및 TIMP-1 발현에 대한 Ab4-7의 효과를 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 이를 위해 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에 Ab4-7을 농도별 (10, 20, 30 및 40  $\mu\text{g/mL}$ )로





**Figure 7.** Effect of Ab4-7 on the mRNA of MMP-9, MMP-12 and TIMP-1 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g/mL}$ ) of Ab4-7 or LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. Total RNA was isolated and quantified by beta-actin for quantitative comparison and expressed as a comparative graph, and the level of mRNA expression of MMP-9, MMP-12 and TIMP-1 were measured by RT-PCR.

처리하여 24 h 배양하였다. 그 결과, MMP-9, MMP-12 및 TIMP-1 mRNA 발현은 LPS 염증 유도 군에서 강력하게 증가하는 결과를 통해, LPS로 인한 염증 반응이 MMPs와 TIMPs의 불균형을 초래하여 MMP-9, MMP-12 및 TIMP-1의 mRNA 발현을 모두 증가시켰으며, Ab4-7의 처리가 MMP-9, MMP-12 및 TIMP-1을 농도 의존적으로 감소시켜 MMPs와 TIMPs의 불균형으로 인한 염증성 피부 질환에 효과가 있을 것으로 사료 된다(Figure 7).

### 3.9. 인체 철평시험에 의한 Ab4-7의 피부자극 평가

*In vitro* 항염증 활성 스크리닝 결과 Ab4-7이 효과적인 항염증 효능이 있다고 판단되어, 인체 피부에서의 피부 자극 정도를 평가하기 위하여 액상 상태의 Ab4-7 1% 용액을 32 명의 피험자에 철평 하여 인체 철평 시험을 실시하였다. 그 결과, reaction grade가 0.0으로 32 명의 피험자에서 모두 음성반응을 보여, Ab4-7은 인체 피부 일차 자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판단된다(Table 4).

**Table 4.** Results of Human Skin Primary Irritation Test of Ab4-7

No	Test sample	No. of responder	Reaction grade		
			24 h	48 h	Mean
1	Ab4-7	0	0.0	0.0	0.0
2	Negative control	0	0.0	0.0	0.0

## 4. 고 찰

염증성 피부질환은 외부의 다양한 자극에 의해 피부에서 일어나는 피부 면역반응의 결과이다. 면역 반응이 활성화된 피부는 다양한 염증성 cytokine을 분비하여 피부의 표피나 진피로 림프구, 대식세포와 같은 면역 세포들의 침투를 유도한다. 이러한 피부에서의 염증반응은 아토피, 성인 여드름과 같은 염증성 피부질환을 동반한다. 최근 들어, 이러한 염증성 피부질환들을 치료하기 위해 천연 소재를 이용한 기능성 소재 개발은 지속적으로 증가하는 추세이며, 웰빙 트렌드에 맞는 소재 개발들이 매우 활발하게 진행되고 있다. 특히, 항균펩타이드는 선천성면역체제에서 매우 중요한 생체방어물질로서 미생물의 세포막에 작용하는 membrane-active 메커니즘으로 항균펩타이드가 세포막 구성 성분들과 이온결합 및 소수성 결합 등의 상호작용을 통하여 막에 구멍(pore)을 뚫거나 결합함으로써 다양한 항균, 항염 및 항암 등의 효과를 나타내며, 국내에 자생하는 천연 식물 외에 해양에서 서식하는 해양생물까지 연구 폭이 확대되고 있다. 본 연구에서는 디자인된 항균펩타이드인 Ab4-7을 이용하여 기능성 천연 소재로서의 가능성을 연구하였다. 항염 활성을 조사하기 위해서 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS로 유도된 염증 반응에서 LPS에 의해서 유발된 TLR4의 과발현을 의미 있게 감소시켰으며,

iNOS 및 COX-2와 같은 염증성 매개체뿐만 아니라 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6 그리고 TNF- $\alpha$ 의 생성 및 발현이 Ab4-7에 의하여 현저히 억제됨을 확인하였다. 또한, 염증 반응으로 증가한 cytokine에 의해 발생하는 MMPs와 TIMPs의 불균형에서 Ab4-7이 MMP-2, MMP-9 그리고 TIMP-1의 mRNA 발현이 조절됨을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 이상의 결과들을 종합해보면, Ab4-7이 해양생물 유래 항균펩타이드로서 항산화 그리고 항염증에 강력한 효능을 가지고 있으며, 과도한 염증 반응이 원인이 되어 발생하는 아토피, 여드름 등과 같은 다양한 염증성 피부질환에서 Ab4-7이 천연 물질 유래 항균펩타이드로서 안정성, 유효성이 매우 뛰어난 원료이며, 다양한 염증성 피부질환 개선 기능성 원료로서의 이용 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

### Acknowledgement

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “지역기업 혁신성장 지원(R&D, P0010140)”사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

### Reference

1. S. H. Moon, E. J. Yang, B. B. Song, B. M. Kim, J. S. Lee, and I. S. Kim, Effects of benzene, phenol and hydroquinone on proliferation, differentiation and migration of human eosinophilic EoL-1 cells, *J. Exp. Biomed. Sci.*, **16**(3), 179 (2010).
2. S. A. Kim, S. C. Choi, Y. H. Youn, C. I. Ko, Y. S. Ha, and I. A. Lee, Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Dioscorea Japonica* and *Chenopodium album*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **43**(4), 337 (2017).
3. M. L. McDaniel, G. Kwon, J. R. Hill, C. A. Marshall, and J. A. Corbett, Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes, *Proc. Soc. Exp. Biol Med.*, **211**(1), 24 (1996).
4. S. M. An, H. G. Kim, E. J. Choi, H. H. Hwang, E. S. Lee, J. H. Beak, Y. C. Boo, and J. S. Koh, Screening for anti-inflammatory activities in extracts from Korean herb medicines, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **40**(1), 95 (2014).
5. E. G. Lee, B. M. Mickle-Kawar, and R. M. Gallucci, IL-6 deficiency exacerbates skin inflammation in a murine model of irritant dermatitis, *J. Immunotoxicol.*, **10**(2), 192 (2013).
6. M. Kamsteeg, P. A. Jansen, I. M. van VlijmenWillems, P. E. van Erp, D. Rodijk-Olthuis, P. G. van der Valk, T. Feuth, P. L. Zeeuwen, and J. Schalkwijk, Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis, *Br. J. Dermatol.*, **162**(3), 568 (2010).
7. J. Seneschal, E. Kubica, L. Boursault, J. Stokkermans, C. Labreze, B. Milpied, K. Ezzedine, and A. Taieb, Exogenous inflammatory acne due to combined application of cosmetic and facial rubbing, *Dermatology*, **224**(3), 221 (2012).
8. K. Aono, K. Isobe, K. Kiuchi, Z. H. Fan, M. Ito, A. Takeuchi, M. Miyachi, I. Nakashima, and Y. Nimura, *In vitro* and *in vivo* expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: involvement of other cytokines, *J. Cell. Biochem.*, **65**(3), 349 (1997).
9. H. M. Lee, J. H. Choi, C. S. Choi, S. J. Hwang, and H. L. Lee, Expression of MMP-9 and TIMP-1 in the nasal mucosa of allergic rhinitis, *Korean J Otolaryngol.*, **43**(6), 604 (2000).
10. J. T. Lee, K. J. Woo, and T. K. Kwon, Effect of sulfuraphane on LPS-induced matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression, *Journal of Life Science*, **20**(2), 275 (2010).
11. J. W. Lim, Y. J. Cho, D. H. Lee, B. C. Jung, H. S. Kang, T. J. Kim, K. J. Rhee, T. U. Kim, and Y. S. Kim, Upregulation of MMP is mediated by MEK1 activation during differentiation of monocyte into macrophage, *J. Exp. Biomed. Sci.*, **18**(2), 104 (2012).
12. M. Steenport, K. M. Faisal Khan, B. Du, S. E. Barnhard, J. Andrew, and D. J. Falcone, Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: Evidence for the role of TNF- $\alpha$  and cyclooxygenase-2, *J. Immunol.*, **183**(12), 8119 (2009).
13. S. Ryan, A. G. Abdel, A. Nikola, and N. Salvador, Suppression of LPS-induced matrix-metalloproteinase responses in macrophages exposed to phenytoin and

- its metabolite, 5-(p-hydroxyphenyl)-, 5-phenylhydantoin, *Journal of Inflammation*, **7**(48), 48 (2010).
14. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Am. J. Pathol*, **107**(3), 395 (1982).
  15. R. K. Oh, M. J. Lee, Y. O. Kim, B. H. Nam, H. J. Kong, J. W. Kim, C. M. An, and D. G. Kim, Isolation and purification of antimicrobial peptide from hard-shelled mussel, *Mytilus coruscus*, *Journal of Life Science*, **26**(11), 1259 (2016).
  16. J. K. Seo, Screening and purification of an antimicrobial peptide from the gill of the *Manila clam ruditapes philippinarum*, *Korea. J. Fish Aquat Sci*, **49**(2), 137 (2016).
  17. C. S. You, J. H. Jung, and D. K. Lee, An effect of resveratrol on the formation of lipid membrane fragmentations caused by the interaction between antimicrobial peptide pexiganan (MSI-78) and lipid bilayer membranes, *Biomater. Res*, **17**(4), 168 (2013).
  18. H. S. Kim, H. S. Jeong, J. Kim, A. Y. Yun, K. W. Lee, and S. H. Cho, Substitution effect of fish meal and *saccharina* with soybean meal and rice bran in the extruded pellet on juvenile abalone *Haliotis discus* (Reeve 1846), *Korean. J. Fish Aquat Sci*, **50**(6), 731 (2017).
  19. S. Y. Lim, Cytotoxic and antioxidant activities of abalone (*Haliotis discus hannai*) extracts, *Journal of Life Science*, **24**(7), 737 (2014).
  20. S. M. Lee, C. S. Park, and D. S. Kim, Effects of dietary herbs on growth and body composition of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*, *Korean. J. Fish Aquat Sci*, **34**(5), 570 (2001).
  21. S. Y. Moon, H. S. Yoon, D. C. Seo, and S. D. Choi, Growth comparison of juvenile abalone, in different culture systems in the west coast of Korea, *J. Aquaculture*, **19**(4), 242 (2006).
  22. M. J. Yoo and H. J. Chung, Optimal manufacturing condition and quality properties of the drinking of disk abalone, *Koran. J. Food Culture*, **22**(6), 827 (2007).
  23. J. K. Seo, M. J. Lee, B. H. Nam, and N. G. Park, cgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Fish Shellfish Immunol*, **35**(2), 480 (2013).
  24. J. K. Seo, H. J. Go, C. H. Kim, B. H. Nam, and N. G. Park, Antimicrobial peptide, hdMolluscidin, purified from the gill of the abalone, *Haliotis discus*, *Fish Shellfish Immunol*, **52**, 289 (2016).
  25. B. H. Nam, J. Y. Moon, E. H. Park, Y. O. Kim, D. G. Kim, H. J. Kong, W. J. Kim, Y. J. Jee, C. M. An, N. G. Park, and J. K. Seo, Antimicrobial activity of peptides derived from olive flounder lipopolysaccharide binding protein/bactericidal permeability-increasing protein (LBP/BPI), *Mar Drugs*, **12**(10), 5240 (2014).
  26. R. I. Lehrer, M. Rosenman, S. S. I. Harwig, R. Jackson, P. Eisenhaur, Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides, *J. Immunol Methods*, **137**(2), 167 (1991).
  27. World Mediccal Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, *JAMA : the journal of the American Medical Association*, (2013).
  28. Korea Food & Drug Administration, Clinical test and *in vitro* test guideline for cosmetics (2011).
  29. P. J. Frosch and A. M. Kligman, The soap chamber test, A new method for assessing the irritancy of soaps, *J. Am. Acad. Dermatol*, **1**(1) 35 (1979).
  30. Y. Yamamoto, P. He, T. Klein, and H. Friedman, Endotoxin induced cytotoxicity of macrophages is due to apoptosis caused by nitric oxide production, *J. Endotoxin Research*, **1**(3), 181 (1994).
  31. S. Y. Kim, Effects of long-term treadmill exercise on heme oxygenase-1 expression in mouse tissues, *Exercise Sci*, **19**(1), 15 (2010).
  32. J. L. Adams and C. J. Czuprynski, Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7, *Microbial pathogenesis*, **16**(6), 401 (1994).
  33. M. Iwamoto, M. Kurachi, T. Nakashima, D. Kim, K. Yamaguchi, T. Oda, Y. Iwamoto, and T. Muramatsu, Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264. 7 cells, *FEBS lett*, **579**(20), 4423 (2005).