

대식세포에서 팽생이모자반 추출물의 MAPKs 기전 통한 면역활성 증가 효과

Immune enhancing activity of *Sargassum horneri* extracts via MAPK pathway in macrophages

김동섭^{†1}, 김민지^{†1,3}, 성낙윤¹, 한인준¹, 김건¹, 김춘성², 유영춘³, 정윤우^{1*}

¹ 한국프라임제약(주), 광주광역시 61473, 한국

² 조선대학교 치과대학 구강생화학, 광주광역시 61452, 한국

³ 건양대학교 의과대학 미생물학교실, 대전광역시 35365, 한국

(Received 23 Feb 2023, Revised 19 May 2023, Accepted 22 May 2023)

Abstract *Sargassum horneri* (SH), a brown macroalgae, has medicinal properties. The present study investigated the immune-enhancing effects of SH extract on peritoneal macrophages (PM). The SH significantly increased the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and nitric oxide (NO) in PM. It was confirmed that SH significantly increased NO expression through the increase of iNOS protein expression, which is the up-regulation pathway. Additionally, it was determined if SH activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, an upper regulatory mechanism that influences TNF- α , IL-6, and NO expression. Consequently, SH significantly increased the phosphorylation of p38, extracellular signal-regulated kinases (ERK), and c-Jun N-terminal kinase (JNK), all of which are MAPK pathway proteins. Moreover, the immune-enhancing effects of SH on another macrophage cell line, bone marrow-derived macrophages were investigated. It was observed that SH significantly enhanced TNF- α , IL-6, and NO production. Overall, this study demonstrates the immune-enhancing effects of SH on macrophages via activated MAPK pathway. Therefore, it suggests that SH has the potential to improve immunological activity in various macrophage cell lines and can be useful as an immune-enhancing treatment.

Keywords : *sargassum horneri*, immune-enhance, MAPK pathway, peritoneal macrophagy, bone marrow derived macrophage

서 론

해양에 서식하는 해조류는 다량의 fucoxanthin, fucoic acid 및 Alginic acid 등을 함유하고 있어 다양한 생리 활성을 유도할 수 있는 천연자원으로 주목을 받고 있다[1-3]. 해조류 중 모자반류는 갈조류에 속하며 어류 및 갑각류 등 해양 생물의 먹이, 번식지 및 서식지 등을 제공하며 탄소 순환에도 중요한 역할

을 한다. 모자반목 모자반과에 속하는 갈조류인 팽생이모자반은 (*Sargassum Horneri*, SH) 일본, 중국 및 한국의 연안 해역에서 발견되는 종으로 일본에서는 식용으로 이용되는 것으로 보고되고 있다[4,5]. 국내에서는 제주, 전남 및 남해안에 중국으로부터 유입된 대규모 팽생이모자반 유조로 인해 어업 활동의 피해 및 악취로 인한 관광업 등의 문제가 발생하고 있다[5-7]. 이를 계기로 한국 정부에서는 팽생이

* Corresponding author

Phone: 82+31-8025-6920 Fax: 031-888-6699

E-mail: jwy87@naver.com

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

모자반을 유용한 소재로 개발하기 위한 연구를 진행하고 있으며, 현재 산업, 제약, 농업 및 식품업 등 다양한 분야에서 팽생이모자반을 활용한 다양한 제품개발이 완료되고 있다[8,9].

최근 연구에 따르면 팽생이모자반은 항염증[10,11], 항암[12,13], 항산화[14,15] 및 면역증강[16] 등의 유용한 효과가 있음이 밝혀졌다. 따라서 팽생이모자반은 현재 개인 건강 증진을 위한 재료로 인식되고 있다. 우리는 이전 연구를 통해 팽생이모자반 추출물이 면역 저하 동물모델에서 면역 체계의 활성화를 통해 면역 조절이 가능함을 밝혔다[16]. 또한 대식세포 및 면역세포의 활성화를 통해 면역증강의 효과 및 활성화 기전에 대해 밝혔다[17]. 하지만 이전 연구 결과에서는, 다양한 종류의 대식세포 중 일부에 국한되어 효능을 확인한 사실에 한계점이 있다.

면역은 우리 체내에서 내외부로부터 유입된 대사산물, 병원체 및 알레르겐 등을 제거하는 과정을 거쳐 인체 내의 항상성을 유지하고 질병을 예방해주는 역할을 수행한다[18]. 면역 시스템은 선천면역과 후천면역으로 나누어진다[19]. 선천면역은 대사산물, 병원체 등의 내외부 요인 자극을 통해 대식세포, 수지상세포, 호중구, 단핵구 및 자연살해세포 등의 탐식세포들이 즉각적으로 활성화되어 짧은 시간 내에 반응하여 면역 작용을 한다[20]. 선천면역에 관여하는 세포 중 하나인 대식세포는 항원을 인식하여 포식하고, 사이토카인인 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 등을 생성한다. 대식세포의 활성화는 면역 조절인자인 iNOS 및 NO 활성화 및 생성을 유도하여, 수지상세포 및 자연살해세포 등의 활성을 유도한다. 또한, 외부 항원에 반응하여 T 세포의 활성화 및 분화를 조절 함으로써, 후천 면역의 활성화 유도 역할을 한다[21-23]. 인체 내의 이러한 면역 작용의 저하는 감염, 질병 유발, 종양 발생 및 치유 지연 등의 요인이 되는 것으로 밝혀져 있다[24]. 따라서 최근 면역 활성화를 통한 체내의 방어체계 향상은 삶의 질적 향상에 중요한 전략으로 대두되고 있다.

본 연구에서는 bone marrow derived macrophage 및

peritoneal macrophage에 팽생이모자반 추출물을 처리하여 세포 생존율, 사이토카인 (IL-6, TNF- α), NO 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 또한, peritoneal macrophage에서 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호전달경로 활성화에 미치는 영향을 확인함으로써 팽생이모자반의 면역 활성 효능 및 작용 기전을 규명하고, 면역 조절 천연물로서의 개발 가능성을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 항체

단백질 분석을 위하여 본 실험에 사용된 p-p38, p38, p-ERK, ERK, I κ B 및 β -actin 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, Ma, USA)에서 구입하였고, iNOS 항체는 abcam (cambridge, UK) 구입하였으며, p-JNK, JNK 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. Bone Marrow derived Macrophage 및 Peritoneal macrophages 세포 배양 및 약물 처리

2.1 bone marrow derived macrophage 세포 배양

bone marrow derived macrophage (골수 유래 대식세포, BMDM)를 추출하기 위해, 마우스의 대퇴골과 경골을 2개씩, 한 마리 당 총 4개의 뼈를 분리하였다. 각 뼈의 골두와 골단 부분을 잘라 원통으로 만든 후 주사기를 이용하여 IMDM (2% pen strep) 배지를 뼈 하나당 10 mL 주입하여 50mL tube에 골수세포를 수확하였다. 이를 원심분리 하여 상등액을 제거하고 150 π dish에 IMDM 배지 (54% IMMD, 33% L929 배양 상등액, 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 1% pen strep, 1% MEM NEAA) 30 mL을 넣고 대식세포로 분화될 때까지 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 세포 배양기에서 7~8일간 배양하였다.

2.2 Peritoneal macrophage 세포 배양

peritoneal macrophage(복강대식세포)를 분리하기 위해 마우스에 2 mL의 3% thioglycollate (DIFCO, Detroit, USA)를 복강에 주사하고, 3일 후 마우스를 희생시키고 주사기 (henke-ject, Tuttingen, Germany)를 이용하여 복강에 10 mL의 RPMI 1640 (2% pen strep) 배지를 주입하고 손가락으로 마사지한 후, 다시 주사기로 복강 세포가 현탁된 배지를 수확하였다. 이를 3회 반복하여 약 20~25 mL의 복강 세포 현탁액을 수확하였다. 이를 원심분리하여 상등액을 제거하고 RPMI 1640 배지에 복강 세포를 현탁시킨 후 세포를 trypan blue로 염색하여 hemacytometer 상에서 계수하여 각 실험에 사용하였다.

3 MTT assay

대식세포에 대한 팽생이모자반추출물 (SH)의 세포독성 및 생존능은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay로 측정하였다. 본 연구에 사용된 SH 샘플은 전라남도 완도 일대에서 채취한 팽생이모자반으로, 원물대비 40배에 해당하는 정제수를 가하여 90°C에서 4시간 동안 열수 추출 후 분무 건조한 원료이다. 한국프라임제약(주)으로부터 제공받아 실험에 사용하였으며, 모든 실험은 해당 샘플로 진행하였다. 대식세포 (2×10^4 cells)에 SH를 농도별로 24시간 처리한 후 세포의 생존능을 측정하였다. 배양된 96-well microplate의 각 well마다 MTT (5 mg/mL)을 10 μ L 첨가하여 2시간 동안 추가로 배양한 후 원심분리하여 상등액을 제거한 뒤, DMSO (dimethyl sulfoxide)를 100 μ L 첨가하여 10분간 교반한 후 microplate spectrophotometer (bio-rad, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4 IL-6, TNF- α , Nitric oxide (NO) 생성 측정

4.1 Nitric oxide (NO) 생성량 측정

대식세포에서 NO 생성량은 Griess reagent kit (Promega; Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다. 48 well plate에 대식세포를 5×10^4 cell/well로 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에 12시간 동안 배양하

면서 세포를 완전히 부착시켜 SH를 각각 맞는 농도로 처리하였고, 양성대조군인 lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) 또한 1 μ g/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 분리하였다. 분리된 배양 상등액 100 μ L에 동량의 Griess (Sigma-Aldrich) 시약을 처리하여 10분 동안 암실에서 반응시킨 후, micro-plate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂, Sigma-Aldrich)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

4.2 IL-6 및 TNF- α 분비 유도능 평가

48 well plate에 대식세포를 5×10^4 cell/well로 분주한 후 SH를 각각 맞는 농도로 처리하였고, 양성대조군인 LPS 또한 1 μ g/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 분리하였다. 분리된 배양상등액의 IL-6 및 TNF- α 함량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 사이토카인의 농도는 kit에 포함되어 있는 표준용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석

대식세포에 대한 SH의 mRNA 발현을 측정하기 위해, 대식세포 (4×10^5 cells)를 6-well micro plate의 well마다 넣어준 뒤 SH를 o/n처리한 후 LPS를 24시간 처리하였다. 분리된 세포를 PBS로 세척하고 RNeasy mini kit (QIAGEN)를 사용하여 total RNA를 추출하였고, total RNA에서 cDNA를 합성하는데 maximeTM RT pre-mix (Intron, Korea)을 사용하였다. 합성된 cDNA에 primer를 넣고 real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) 방법으로 증폭시켜 mRNA를 합성하여 7500 fast system (applied biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용해 측정하였다. 측정하고자 하는 mRNA는 GAPDH로 수치를 정량화 하였고 7500 software (ver. 2.3, applied biosystems, CA, USA)을 사용하여 계산하였다. mRNA

primer는 cosmo genetech (Seoul, Korea)에서 아래 표와 같이 만들어 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Primer sequences used for real time-PCR

Gene	Primer	Sequence
IL-6	Forward	5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3'
	Reverse	5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'
TNF-α	Forward	5'-GAG AAG TTC CCA AAT GGC-3'
	Reverse	5'-ACT TGG TGG TTT GCT ACG-3'

6. Western blot 분석에 의한 단백질 발현 분석

대식세포에 대한 SH의 단백질 발현을 측정하기 위해, 대식세포 (4×10⁵ cells)를 6 well plate의 각 well마다 넣어주고 SH를 o/n 처리한 후 LPS를 20분 배양 후 원심분리하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 PBS로 세척 한 다음, nuclear and cytoplasmic extraction reagents kit (thermo scientific inc.)를 사용하여 세포질 내의 단백질을 분리하였고 BCA protein detection kit (thermo scientific inc.)를 사용하여 정량하여 10% tris-glycine mini gel (Invitrogen)에 well당 20 µg의 단백질을 loading하여 SDS-PAGE로 분리하였다. 이를 PVDF (poly-vinylidene difluoride membrane, Invitrogen)로 transfer 한 후, membran을 10 mL의 blocking solution에 2시간 동안 방치한 후 이를 제거하고 1차 항체를 1:1,000으로 5% skim milk에 희석하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이후 TBS-tween 20 (Intron)으로 10분씩 4회 세척하고, 2차 항체를 5% skim milk에 1:3,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, TBST로 10분간 4회 세척하였으며, west femto maximum sensitivity substrate와 LAS-4000 (GE healthcare life sciences)을 이용하여 밴드를 분석하였다.

7. 통계 분석

본 연구에 대한 실험결과는 통계분석 SAS 8.2를 이용하여 Two-way ANOVA (Analysis of variation) 검정을 실시한 후, Bonferroni post tests의 다중범위검정과 Student's t test로 p < 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 실험군은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과로 사용하였으며 정량적 결과는 대조군에 대한 백분율로 평균 ± 표준편차로 나타냈다.

결 과

괘생이모자반 추출물이 bone marrow derived macrophage 세포의 생존율에 미치는 영향

대식세포는 선천면역과 적응면역에서 필수적인 역할을 하며 모든 조직과 기관에 분포한다. 대식세포 집단은 집단 사이에서 뚜렷한 형태학적 차이와 이질성이 있음이 밝혀졌다[25]. 복강 대식세포와 골수 유래 대식세포 (bone marrow derived macrophage, BMDM) 모두 대식세포의 종류로, 면역 반응 조절 및 병원체 제거 등의 공통적 역할을 하지만 사이토카인 (IL-6, TNF-α 및 IL-10) 발현 및 T 세포 활성화 조절 등과 같은 기능 면과 성장 기원의 차이가 있다 [26]. 대표적으로 Toll-like receptor 4 (TLR4)-MAPK 기전을 통한 염증 조절을 하는 복강대식세포 와 비교하여 골수 유래 대식세포의 경우 NLRP3 - caspase 1 - IL 1β 기전의 조절이 면역 및 염증 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 [27]. 본 연구에서는 괘생이모자반추출물 (SH)가 면역조절 효과가 있는지 확인하기 위해 골수 유래 대식세포 및 복강대식세포에서 공통적으로 발현하는 IL-6, TNF-α 그리고 NO의 발현 여부 확인하였다. 효능을 확인하기 전 SH의 세포독성 여부를 평가하기 위하여 골수 유래 대식세포에 SH를 12.5~1000 µg/ml 농도까지 처리한 뒤, 24시간 배양한 후 MTT assay를 수행하였다 (Fig 1). SH를 처리하지 않고 배양한 0 µg/ml (Blank) 군의 세포 생존율 100%와 비교하여, SH를 처리한 경우에는 100 µg/ml 농도까지 세포 생존율에 변화가 없었으며, 250 µg/ml부터 유의적인 세포독성이 나타남을 확인하였다. 따라서 우리는 향후 독성이 없는

100 µg/ml 이하의 농도를 선정하여 실험을 진행하였다.

대식세포 활성을 유도하여 면역 조절할 수 있음을 확인하였다.

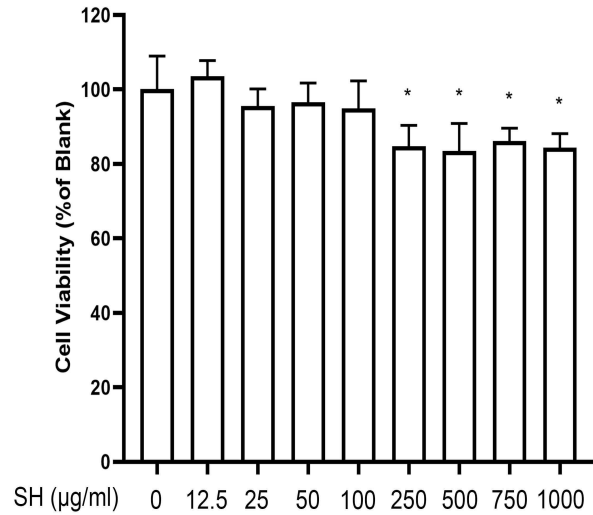


Figure 1. Effect of *Sargassum horneri* (SH) extracts on the cell viability in Bone marrow-derived macrophage cell (BMDM). SH were treated at the concentration of 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 750 and 1000 µg/ml. after 24h, cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as the mean±SD (n=3). statistical analysis was performed using Student’s t-test with a significant level of * <0.05 compared to Blank (0 µg/ml) group.

괘생이모자반 추출물이 bone marrow derived macrophage 에서 IL-6, TNF-α 및 NO 생성에 미치는 영향

골수 유래 대식세포에서 IL-6, TNF-α 및 NO는 다른 대식세포와 동일하게, 대식세포의 활성화에 중요한 인자로 알려져 있다. SH 처리가 대식세포 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 골수 유래 대식세포에 SH 처리 후 IL-6, TNF-α 및 NO 생성 정도를 측정하였다. 그 결과, 염증 및 감염에 대한 면역반응을 조절하는 사이토카인인 IL-6 및 TNF-α가 농도의존적으로 생성됨을 확인하였다(Fig 2A, B). 또한, 면역 항상성 조절에 중요한 역할을 하는 NO 생성 역시 SH 처리 후 농도 의존적으로 유의적인 증가가 나타남을 확인하였다(Fig 2C). 이는 SH 처리가 골수 유래

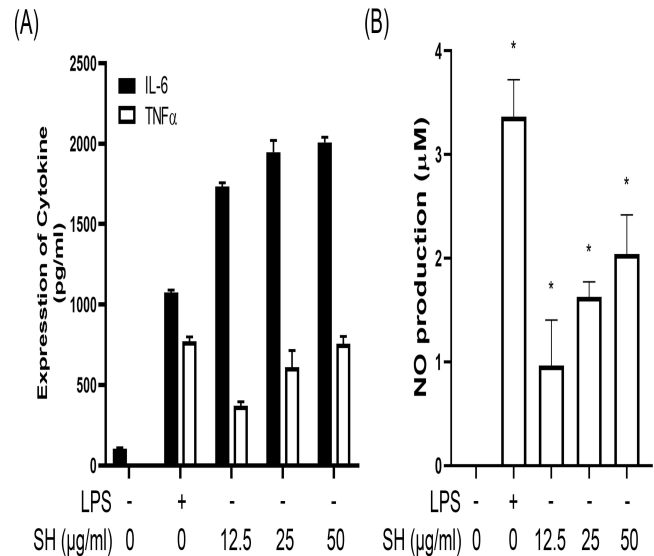


Figure 2. Effect of *Sargassum horneri* (SH) extracts on the (A) TNF-α production, (B) IL-6 production (C) NO production in bone marrow-Derived macrophage. SH were treated at the concentration of 12.5, 25 and 50 µg/ml. And we used LPS (1µg/ml) for positive control. after 24h, (A-C) cytokine(IL-6, TNF-α) and NO production in culture supernatant were investigated by Elisa kits. Results are expressed as the mean±SD (n=3). statistical analysis was performed using Student’s t-test with a significant level of * <0.05 compared to Blank (0 µg/ml) group.

괘생이모자반 추출물이 Peritoneal macrophage의 생존율에 미치는 영향

SH의 세포독성 평가를 위해 Peritoneal macrophages (복강대식세포) 세포에 SH를 각각 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 MTT assay를 진행하였다 (Fig. 3). SH를 처리하지 않은 음성대조군 (Blank)군과 비교하여 SH를 12.5~1000 µg/ml 농도까지 처리한 결과, 100 µg/ml부터 유의적인 세포사멸이 나타남을 확인하였다. 따라서 SH의 12.5, 25 및 50 µg/ml 농도는 복강대식세포에서 세포독성이 없음을 확인하였다.

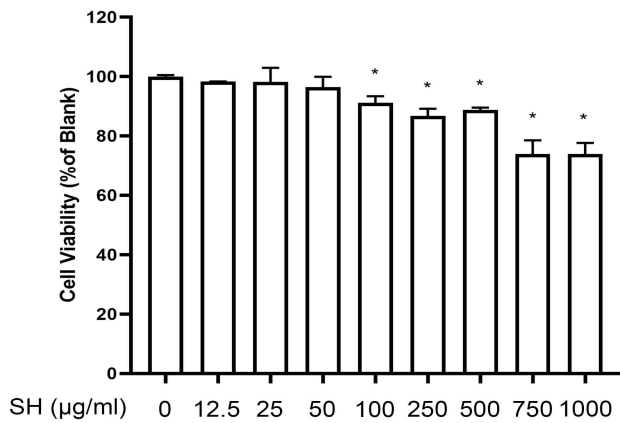


Figure 3. Effect of *Sargassum horneri* (SH) extracts on the cell viability in Peritoneal macrophages. SH were treated at the concentration of 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 750 and 1000 µg/ml. after 24h, cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as the mean±SD (n=3). statistical analysis was performed using Student’s t-test with a significant level of *<0.05 compared to Blank (0 µg/ml) group.

팽생이모자반 추출물이 Peritoneal macrophage의 IL-6 및 TNF-α 생성에 미치는 영향

대식세포는 선천면역을 담당하는 주요 세포로 세포 조직이나, 암세포 등 체내에 기본적으로 존재하지 않은 물질이나 비정상적 단백질을 흡수하고 소화하는 식세포 작용을 한다[28,29]. 대식세포는 선천면역 및 적응면역 등 대부분의 면역 작용에 관하여 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 대식세포의 활성화는 분비되는 NO 및 사이토카인 (TNF-α, IL-6 및 IL-1) 등의 증가를 통해 확인할 수 있으며, 특히 TNF-α 및 IL-6 와 같은 사이토카인은 감염 초기에 반응에 관여한다[30,31]. 대식세포에서 분비된 TNF-α는 성숙된 형태의 면역세포로 전환하기 위하여, 미성숙 면역세포의 단백질 또는 보조 자극인자의 발현을 증가시킨다. 성숙된 면역세포는 항암 및 항원에 의해 오염된 세포 등의 살해능력을 증가시켜 초기 면역 반응에 중요한 역할을 한다[32,33]. IL-6는 광범위한 면역 및 조혈 활동을 유도하는 능력으로 인해 숙주 방어에서 중요한 역할을 한다[34,35]. 본 연구 결과에서는 SH 처리가 면역세포를 활성화할 정도의 사

이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 대표적인 사이토카인인 IL-6 및 TNF-α의 생성 정도를 확인하였다.

SH가 대식세포 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 복강대식세포에 SH를 각각 12.5, 25 그리고 50 µg/ml 농도로 처리하였다. LPS는 양성대조군으로 비교하였다. 그 결과 복강대식세포에서 SH 처리는 정상군 (0 µg/ml)과 비교하여 IL-6 및 TNF-α 생성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig 4A, C). 또한, 양성대조군인 LPS의 처리가 IL-6 및 TNF-α 생성을 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

또한, 본 연구는 SH 처리가 IL-6 및 TNF-α의 mRNA 발현에 영향을 주는지 확인하였다. 그 결과, SH 처리는 IL-6의 mRNA 발현양을 25 및 50 µg/ml에서 유의적으로 증가시켰으며, TNF-α의 발현양은 12.5, 25 및 50µg/ml에서 유의적으로 증가 됨을 확인하였다 (Fig 4B, D). 이러한 연구 결과는 SH가 대식세포 활성화의 증가를 통해 면역 활성을 갖는 것을 의미한다. 우리의 선행연구에서 면역세포인 Splenocyte에 SH 처리가 IL-6 및 TNF-α의 생성을 증가시켰으며, 또한 면역 활성 지표인 INFγ 및 IL-2가 유의적으로 증가 됨을 확인하였다[36]. 이를 통해 SH는 대식세포 및 면역 세포의 활성을 유도할 수 있을 것으로 판단된다.

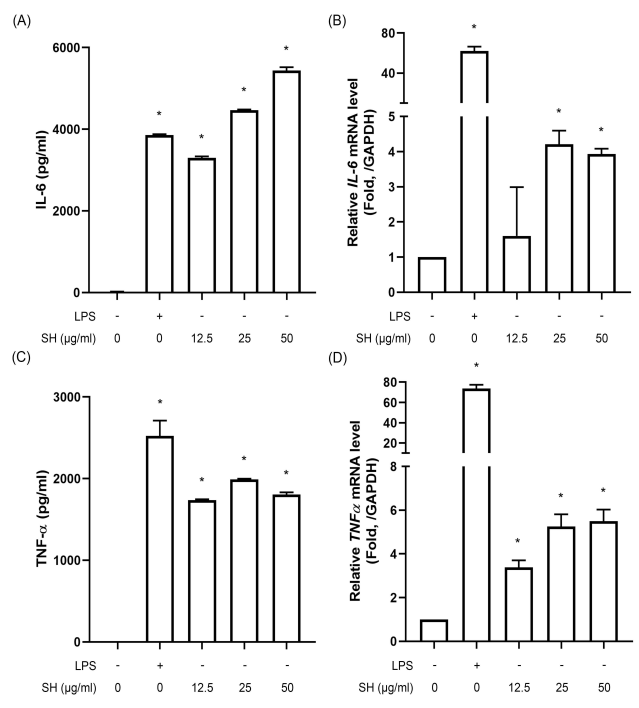


Figure 4. Effect of *Sargassum horneri* (SH) extracts on the (A) IL-6 production, (B) IL-6 mRNA level, (C) TNF- α production, (D) TNF- α mRNA level in Peritoneal macrophages. SH were treated at the concentration of 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$. And we used LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for positive control. after 24h, (A, C) cytokine productions in culture supernatant were investigated by Elisa kits. (B, D) mRAN levels of IL-6 and TNF- α in Peritoneal macrophages cell treated with SH. Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). statistical analysis was performed using Student's t-test with a significant level of * <0.05 compared to Blank (0 $\mu\text{g/ml}$) group.

팽생이모자반 추출물이 Peritoneal macrophage의 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

SH 처리가 복강대식세포 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 세포 상등액 및 세포 단백질에서 NO 및 iNOS 발현 정도를 조사하였다. iNOS는 NO를 합성하는 효소로 염증 반응으로 유도될 수 있으며 대식세포의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져있다[37]. 대부분 조직에 존재하며 사이토카인 (IL-1 및 TNF- α 등), 병원체, 저산소증, 산화스트레스의 자극 등에 대한 반응으로 발현되며, 높은 수준의 생리 활성을 가진다[38-40]. NO는 대식세포, 비만 세포, 호중구 및 자연살해세포 등의 많은 면역 및 염증세포의 성장, 사멸 및 활성을 조절하며[41] iNOS에 의해 생성된 NO는 혈류 조절, 면역반응 및 시냅스 전달을 포함한 다양한 신호전달 인자로 작용한다[17]. 과량의 NO 발현은 염증을 유도하여 정상 세포를 공격하는 독성 염증 질환의 매개 인자로 밝혀져 있으나, 적절한 양의 NO 생성은 면역 신호 전달자로서 외부 저항성을 증가시키는 것으로 알려져 있다[42,43]. 따라서 NO 수준을 조절하는 것은 면역 조절에 있어서 매우 중요하며 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

우리의 연구 결과를 통해 SH 처리 군은 SH가 처리되지 않은 군과 비교 하여 iNOS 단백질 발현도가 농도 의존적으로 증가 되는 것을 확인하였으며(Fig 5B),

또한 최종 산물인 NO 생산량이 SH 처리를 통해 유의적으로 증가 되었음을 확인하였다(Fig 5A). 이는 SH 처리가 iNOS 발현을 통해 NO 생성을 촉진 함으로써 면역 활성을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

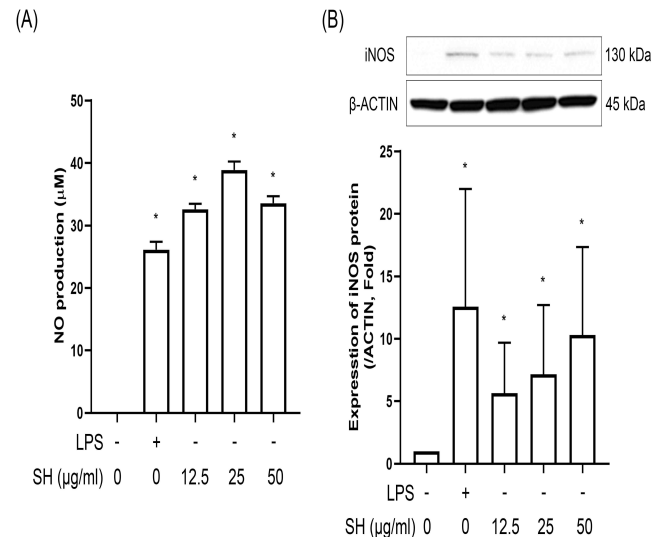


Figure 5. Effect of *Sargassum horneri* (SH) extracts on the (A) NO production, (B) iNOS protein expressions in Peritoneal macrophages. SH were treated at the concentration of 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$. And we used LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for positive control. after 24h, (A) NO productions in culture supernatant were investigated by Elisa kits. (B) Protein levels of iNOS in Peritoneal macrophages cell treated with SH. Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). statistical analysis was performed using Student's t-test with a significant level of * <0.05 compared to Blank (0 $\mu\text{g/ml}$) group.

팽생이모자반 추출물이 Peritoneal macrophage의 MAPKs 활성화에 미치는 영향

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 기본적으로 다양한 세포에서 세포의 증식, 분화 및 사멸 등의 중요 조절자 역할을 한다. MAPK는 면역세포에서 사이토카인 생성, 선천성 면역 세포의 생존력 및 하원 제시세포 (antigen-presenting cell, APC)의 기능을 조절함으로써 선천성 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀 졌다. 또한 사이토카인 생합성 및 세포 증식 조절을 통해 적응 면역 반응을 조절

하는 것으로 알려져 있다[44]. MAPKs는 ERK1/2, JNK, p38 등과 같은 단백질을 포함하는 신호전달경로로 알려져 있으며 p38, JNK, ERK 단백질은 염증, 산화스트레스 및 세포 손상과 같은 자극에 의해 반응하여 활성화된다[45]. MAPK 기전의 주요 기능 중 하나는 대식세포에서 염증을 조절하는 것으로, MAPK 기전의 대표 단백질인 p38, JNK, ERK의 활성화는 사이토카인 (IL-6 및 TNF- α 등)과 NO의 생성을 촉진할 수 있다[46]. 따라서 MAPKs 활성화는 항암 및 면역 조절 등의 연구에 있어서 중요한 기전으로 인식되고 있다. 본 연구는 SH처리가 복강대식세포에서 MAPKs 기전 활성화의 연관성을 확인하기 위하여, 인산화된 p38, JNK, ERK 단백질 발현양을 측정하였다. SH를 처리한 경우, 처리하지 않은 군과 비교하여 p-p38, p-ERK, p-JNK 단백질 발현양이 최고농도인 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 8배, 0.9배 및 3배가 유의적으로 증가 되는 것을 확인하였다 (Fig 6A, B). 양성대조군인 LPS 또한 p-p38, p-ERK, p-JNK 모두 유의적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. MAPK 기전의 활성화는 I κ B의 인산화 및 분해로 이어지며, 이는 핵내로 NF- κ B 이동으로 인한 표적 유전자의 활성을 유도할 수 있다. 핵내로 NF- κ B의 전이에는 사이토카인, 케모카인 및 세포 생존 인자를 포함하여 면역반응 및 염증과 관련된 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다[46]. 따라서 MAPK-I κ B-NF- κ B 경로는 대식세포에서 염증 및 면역을 조절하는데 매우 중요한 역할을 할 수 있다. 우리의 연구 결과를 통해 SH 처리 군은 SH가 처리되지 않은 군과 비교하여 I κ B의 인산화가 증가 됨을 확인하였으며, 또한 전체 I κ B의 양이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig 6A, B). 이는 MAPK의 활성화를 통해 I κ B의 인산화 및 분해가 이루어졌음을 확인할 수 있었으며, 최종적으로 NF- κ B가 증가될 수 있을 것을 예상할 수 있다. 우리는 선행연구에서 Raw 264.7 대식세포에 SH 처리가 MAPK-I κ B-NF- κ B기전의 활성화를 통해 면역증강 효과[17]를 확인하였으며, 이는 다양한 종류의 대식세포에 적용될 수 있음을 예상할 수 있다.

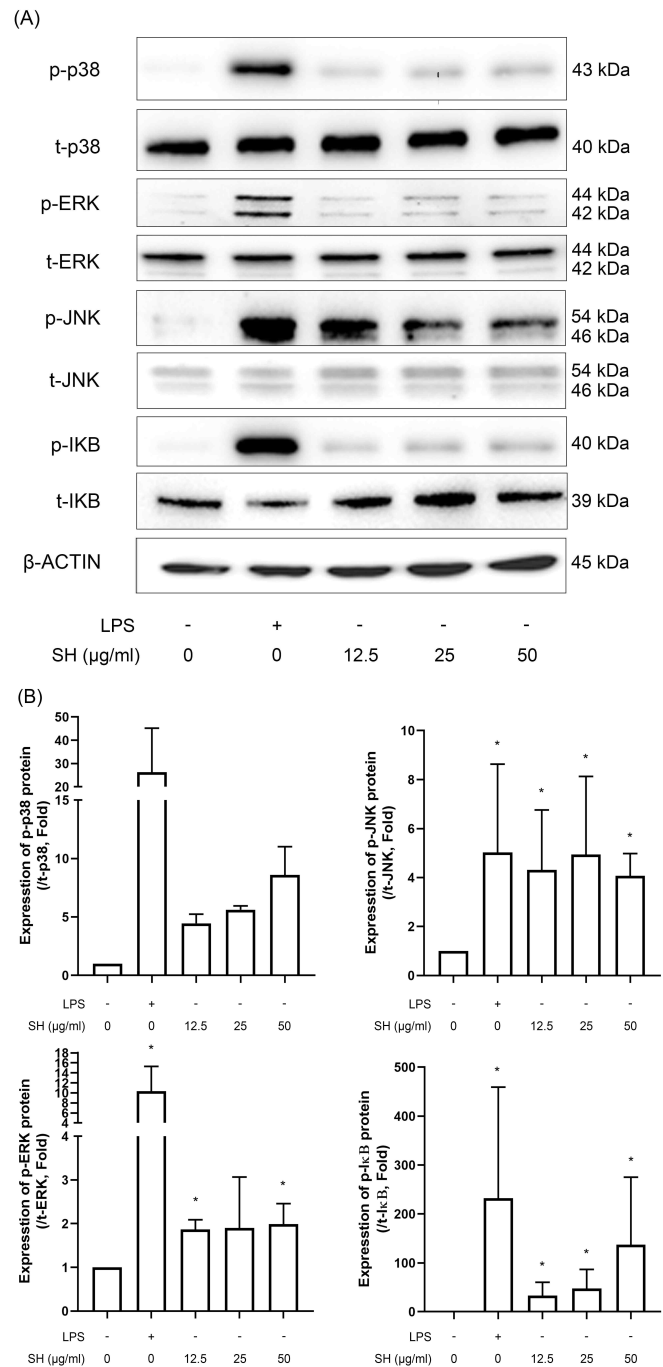


Figure 6. Effect of *Sargassum horneri* (SH) extracts on the MAPKs phosphorylation and I κ B expression. (A, B) MAPKs and I κ B protein expressions were analyzed by Western blot analysis. SH were treated at the concentration of 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ for 30 min. And we used LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for positive control. Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). statistical analysis was performed using Student's t-test with a significant level of * <0.05 compared to Blank (0 $\mu\text{g/ml}$) group.

결 론

본 연구에서는 팽생이모자반추출물 (SH)의 면역활성 효능을 확인하기 위하여, Peritoneal macrophages (복강 대식세포) 및 bone marrow derived macrophage (골수 유래 대식세포)에 SH을 처리하여 면역활성 지표로 IL-6, TNF- α , iNOS 그리고 NO 생성 및 발현 수준을 측정하였다. 또한, 복강 대식세포에서 면역활성을 유도하는 상위 기전을 확인하기 위하여 MAPKs 신호전달경로의 활성화를 확인하였다. 그 결과 복강 대식세포에서 SH 처리는 사이토카인인 IL-6 및 TNF- α 의 mRNA level이 유의적으로 증가되었으며, 또한 IL-6 및 TNF- α 의 분비량이 증가되었다. 면역활성 유도 인자인 iNOS의 단백질 발현이 SH 의해 증가되었으며 iNOS의 활성화를 통한 NO 분비가 촉진됨을 확인하였다. 이러한 SH의 면역증진 효과는 MAPK신호전달 경로를 통해 이루어지고 있음을 확인하였다. 또 다른 대식세포 종류 중 하나인 골수 유래 대식세포에서 SH 처리는 앞선 결과와 유사하게, IL-6, TNF- α , 그리고 NO 생성이 유의적으로 증가 되는 것을 확인하였다.

본 연구는 팽생이모자반추출물의 면역활성 증진 가능성을 제시하며, 면역증진 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 보여준다. 또한, 대부분 수입되고 있는 면역증진을 위한 기능성 원료에 대한 수입대체 효과를 기대할 수 있으며, 면역 증진 개별인정형 기능성 원료 소재 및 건강기능식품 개발에 기초적인 자료로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 추가로, 본 연구에서는 골수 유래 대식세포에서 면역증진 효능을 조절하는 상위 기전 연구 및 면역증진 활성 성분에 대한 규명이 부족하여 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임. (20210656, 빅데이터 기반 바이오헬스케어 유효성 소재 실증 지원)

References

- Xiao, H. Zhao, J. Fang, C. Cao, Q. Xing, M. Li, X. Hou, J. Ji, A. and Song, S. Advances in Studies on the Pharmacological Activities of Fucoxanthin, *Mar Drugs*. **2020** Dec 11; 18(12):634.
- Wang Y, Xing M, Cao Q, Ji A, Liang H, and Song S. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar Dru.*, **2019** Mar 20; 17(3):183.
- Sarithakumari., C. H. Renju. G L. and Muraleedhara Kuru p, G. Anti-inflammatory and antioxidant potential of alginate isolated from the marine algae, *Sargassum wightii* on adjuvant-induced arthritic rats. *Inflammopharmacology*. **2013** Jun; 21(3):261-8.
- Matsumura, Y. Nutrition trends in Japan. *APJCN*. **2001**; 49(4):484-485
- Zhuang, M. Liu, J, Ding, X. 2, He, J. Zhao, S. Wu, L. Gao, S. Zhao, C. Liu, D. Zhang, J. and He, P. *Sargassum* blooms in the East China Sea and Yellow Sea: Formation and management. *Mar Pollut Bull*. **2021** Jan; 162:1118-45.
- Byeon, S. Cheon, K. S. Kim, S. Yun, S. H. Oh, H. J. Park, S. Kim, T. H. Kim, J. and Lee, H. Comparative Analysis of Sequence Polymorphism in Complete Organellar Genomes of the 'Golden Tide' Seaweed *Sargassum horneri* between Korean and Chinese Forms. *Sustainability*. **2020**; 12(18), 7280
- Liu, F. Liu, X. Wang, Y. Jin, Z. Moejes, F.W. and Sun, S. Insights on the *Sargassum horneri* golden tides in the Yellow Sea inferred from morphological and molecular data. *Limnol. Oceanogr*. **2018** Apr; 63, 1762 - 1773.
- Lee, B. J. Lee, S. M. Hyun, J. h. and Kim, Y. Y. Durability Performances of Concrete Produced with Recycled Biopolymer Based on *Sargassum Honeri*. *J. Korean Recycl. Constr. Resour. Inst*. **2019**; 7, 445 - 451.
- Madhavaraj, L. Lim, H. D. Kim, K. M. Kim, D. H. and Han G. H. Influence of *Sargassum horneri* Mitigating Odorous Gas Emissions from Swine Manure Storage Facilities. *Sustainability*. **2020**; 12, 7587.

10. Kim, M. E. Jung, Y. C. Jung, I. Lee, H. W. Youn, H. Y. and Lee, J. S. Anti-inflammatory Effects of Ethanolic Extract from *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh on Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Activation via NF- κ B Pathway Regulation. *Immunological Investigations*. **2015**; 44, 137-146
11. Sanjeeva, K. K. A. Jayawardena, T. U. Lee, H. G. Herath, K. Jee, Y. and Jeon, Y. J. The protective effect of *Sargassum horneri* against particulate matter-induced inflammation in lung tissues of an in vivo mouse asthma model. *Food Funct*. **2019**; 10, 7995-8004
12. Rasin, A. B. Silchenko, A. S. Kusaykin, M. I. Malyarenko, O. S. Zueva, A. O. Kalinovsky, A. I. Airong, J. Surits, V.V. and Ermakova, S. P. Enzymatic transformation and anti-tumor activity of *Sargassum horneri* fucoidan. *Carbohydrate Polymers*. **2020**; 246, 116635
13. Shao, P. Liu, J. Chen, X. Fang, Z. and Sun, P. Structural features and antitumor activity of a purified polysaccharide extracted from *Sargassum horneri*. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2015**; 73, 124-130
14. Lee, J. H. Kim, H. J. Jee, Y. Jeon, Y. J. and Kim, H. J. Antioxidant potential of *Sargassum horneri* extract against urban particulate matter-induced oxidation. *Food Science and Biotechnology*. **2020**; 29, 855-865
15. Lee, G. Midorikawa, Y. Kuda, T. Harada, M. Fujita, S. Takahashi, H. and Kimura, B. In vitro antioxidant and anti-glycation properties of *Sargassum horneri* from golden tides on the South Korean coast and the effect on gut microbiota of mice fed a high-sucrose and low-fibre diet. *Journal of Applied Phycology* **2022**; 34, 2211-2222
16. Kim, H. I. Kim, D. S. Jung, Y. Sung, N. Y. Kim, M. Han, I. J. Nho, E. Y. Hong, J. H. Lee, J. K. Boo, M. et al. Immune-Enhancing Effect of *Sargassum horneri* on Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in BALB/c Mice and Primary Cultured Splenocytes. *Molecules*. **2022**; 27, 8253
17. Kim, D. S. Sung, N. Y. Park, S. Y. Kim, G. Eom, J. Yoo, J. G. Seo, I. R. Han, I. J. Cho, Y. B. and Kim, K.-A. Immunomodulating activity of *Sargassum horneri* extracts in RAW264. 7 macrophages. *Journal of nutrition and health*. **2018**; 51, 507-514
18. Tomasi Jr, T.B. Tan, E.M. Solomon, A. and Prendergast, R. A. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *The Journal of experimental medicine*. **1965**; 121, 101-124
19. Yatim, K. M. and Lakkis, F. G. A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. **2015**; 10, 1274-1281
20. Gourbal, B. Pinaud, S. Beckers, G. J. Van Der Meer, J. W. Conrath, U. and Netea, M. G. Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunological reviews*. **2018**; 283, 21-40
21. Cha, J. H. and Lim, E. M. Effects of *Gardeniae fructus* on cytokines in mouse macrophage. *The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology*. **2014**; 27, 1-16
22. Erwig, L. P. and Rees, A. J. Macrophage activation and programming and its role for macrophage function in glomerular inflammation. *Kidney and Blood Pressure Research*. **1999**; 22, 21-25
23. Jiang, M. H. Zhu, L. and Jiang, J. G. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert opinion on therapeutic targets*. **2010**; 14, 1367-1402
24. Cant, A. and Cole, T. Infections in the immunocompromised. *Adv Exp Med Biol*. **2010**; 659, 1-18
25. Shortman, K.; Wu, L. Are dendritic cells end cells? *Nature Immunology*. **2004**; 5, 1105-1106.
26. Wang, C. Yu, X. Cao, Q. Wang, Y. Zheng, G. Tan, T.K. Zhao, H. Zhao, Y. Wang, and Y. Harris, D. C. H. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology*. **2013**; 14, 6.
27. Swanson K. V. Deng, M. Ting, J. P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019 Aug;19(8):477-489.
28. Mahla, R. S. Kumar, A. Tutill, H. J. Krishnaji, S. T. Sathyamoorthy, B. Noursadeghi, M. Breuer, J. Pandey,

- A.K. and Kumar, H. NIX-mediated mitophagy regulate metabolic reprogramming in phagocytic cells during mycobacterial infection. *Tuberculosis*. **2021**; 126, 102046
29. Nahrendorf, M. Hoyer, F. F. Meerwaldt, A. E. van Leent, M. M. Senders, M. L. Calcagno, C. Robson, P. M. Soultanidis, G. Pérez-Medina, and C. Teunissen, A. J. Imaging cardiovascular and lung macrophages with the positron emission tomography sensor ⁶⁴Cu-macrin in mice, rabbits, and pigs. *Circulation: Cardiovascular Imaging*. **2020**; 13, e010586
30. Sorimachi, K. Akimoto, K. Ikehara, Y. Inafuku, K. Okubo, A. and Yamazaki, S. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. *Cell structure and function*. **2001**; 26, 103-108
31. Kim, Y. E. Lee, J. H. Sung, N. Y. Ahn, D. H. and Byun, E. H. A comparative study of the immuno-modulatory activities of ethanol extracts and crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. *Korean Journal of Food Science and Technology*. **2017**; 49, 453-458.
32. Yoon, T. J. Effect of water extracts from root of *Taraxacum officinale* on innate and adaptive immune responses in mice. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. **2008**; 21, 275-282.
33. Izadpanah, K. Freyer, D. Weber, J.R. and Braun, J.S. Brain parenchymal TNF- α and IL-1 β induction in experimental pneumococcal meningitis. *Journal of Neuroimmunology*. **2014**; 276, 104-111
34. Tanaka, T. Narazaki, M. and Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **2014**; 6, a016295
35. Simpson, R. J. Hammacher, A. Smith, D. K. Matthews, J. M. and Ward, L. D. Interleukin 6: Structure function relationships. *Protein science*. **1997**; 6, 929-955
36. Kim, D. S. Sung, N. Y. Han, I. J. Lee, B. S. Park, S. Y. Nho, E. Y. Eom, J. Kim, G. and Kim, K. A. Splenocyte-mediated immune enhancing activity of *Sargassum horneri* extracts. *Journal of Nutrition and Health*. **2019**; 52, 515-528
37. Hegazy, M. E. F. Hamed, A. R. Mohamed, T.A. Debbab, A. Nakamura, S. Matsuda, and H. Paré, P. W. Anti-inflammatory sesquiterpenes from the medicinal herb *Tanacetum sinaicum*. *Rsc Advances*. **2015**; 5, 44895-44901
38. Stachon, T. Latta, L. Seitz, B. and Szentmáry, N. Hypoxic stress increases NF- κ B and iNOS mRNA expression in normal, but not in keratoconus corneal fibroblasts. *Gräfe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. **2021**; 259, 449-458
39. Li, X. Shang, B. Li, Y. n. Shi, Y. and Shao, C. IFN γ and TNF α synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells *via* the induction of nitric oxide. *Stem cell research & therapy*. **2019**; 10, 1-11.
40. Berríos-Cárcamo, P. Quezada, M. Quintanilla, M.E. Morales, P. Ezquer, M. Herrera-Marschitz, M. Israel, Y. and Ezquer, F. Oxidative stress and neuroinflammation as a pivot in drug abuse. A focus on the therapeutic potential of antioxidant and anti-inflammatory agents and biomolecules. *Antioxidants*. **2020**; 9, 830.
41. Coleman, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International immunopharmacology*. **2001**; 1, 1397-1406
42. Chiou, W. F. Chou, C. J. and Chen, C. F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life sciences*. **2001**; 69, 625-635
43. Hibbs Jr, J.B. Taintor, R.R. Vavrin, Z. and Rachlin, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications*. **1988**; 157, 87-94
44. Liu, Y. Shepherd, E. G. and Nelin, L. D. MAPK phosphatases – regulating the immune response. *Nature Reviews Immunology*. **2007**; 7, 202-212.
45. Corre, I. Paris, F. and Huot, J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*. **2017**; 8.
46. Do, H. T. T. Bui, B.P. Sim, S. Jung, J. K. Lee, H. and Cho, J. Anti-Inflammatory and Anti-Migratory Activities of Isoquinoline-1-Carboxamide Derivatives in LPS-Treated BV2 Microglial Cells via Inhibition of MAPKs/NF- κ

B Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*.
2020; 21, 2319.