

별불가사리 추출물의 면역세포 활성화 효과

채수연¹ · 김미정¹ · 김도순¹ · 박정은¹ · 조성기² · 이성태^{1*}

¹순천대학교 생물학과

²한국원자력연구소 방사선연구원 방사선식품·생명공학팀

Effect of *Asterina pectinifera* Extracts on the Activation of Immune Cells

Su-Yeon Chae¹, Mi-Jung Kim¹, Do-Soon Kim¹, Jung-Eun Park¹, Sung-Kee Jo² and Sung-Tae Yee^{1*}

¹Dept. of Biology, College of Natural Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Radiation Food and Biotechnology Team, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongup Campus of Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

Abstract

In this experiment, the effects of *Asterina pectinifera* extracts on the activation of immune cells were studied. An immune cell activating factor was partially purified from starfish, *Asterina pectinifera*, by means of physiological saline extraction, acetone precipitation and heating inactivation. Starfish extracts increased the proliferation of spleen cells and induced the production of IL-6 and IFN- γ by spleen cells. Also, it increased the proliferation of purified B cells and production of IgM and IgG in the presence of *Asterina pectinifera* extracts. Starfish extract self-induced NO synthesis in mouse macrophage cell line (RAW264.7). When cell lines was treated with extracts, the mRNA expression of inducible NO synthetase (iNOS), TNF- α , IL-6, and GM-CSF were markedly increased in RT-PCR analysis. Therefore starfish extract can self-activate spleen cells, B cells and macrophages. These results might be useful in further studies into a possible immune activating agent from the starfish, *Asterina pectinifera*, for the development of functional foods and drugs.

Key words: *Asterina pectinifera*, B cell, cytokines, immunoglobulins, nitric oxide

서 론

극피동물인 불가사리는 해저의 다양한 곳에서 서식한다. 불가사리는 단단한 외골격을 가지고 있으며, 외골격의 뒤는 관족(管足, tube foot)으로 덮여있어 사냥감을 감싸 안고 소화액을 내어 먹이를 먹을 수 있다. 불가사리의 주된 먹이는 전복, 조개, 굴, 큰가리비, 홍합 등의 이매패류이고, 죽은 물고기까지 무차별적으로 잡아먹는 포식성을 가지고 있다. 이러한 특성 때문에 양식업에 큰 피해를 주는 '해적생물'이라고 알려져 있다. 특히 불가사리는 해양생태계에 뚜렷한 천적이 없으며, 재생력이 뛰어나다(1). 따라서 전복, 굴, 바지락, 백합, 피조개, 새꼬막 등을 양식하는 어장은 불가사리로 인해 연간 수확량이 줄어드는 큰 피해를 입고 있다.

최근 불가사리에서 추출한 천연물에 대한 연구가 많이 보고되고 있는데, *Sphaerodiscus placenta*에서 분리한 polyhydroxysteroids와 steroidal glycosides(2), *Hacelia attenuata*에서 분리한 polyhydroxylated sterol(3), *Halityle regularis*에서 분리한 starfish saponins 중에서 22, 23-epoxysteroidal glycoside sulfate(4,5)와 *Asterias vulgaris*에

서 분리된 saponin(6)은 소염, 진통효과가 있으며, *Asterina pectinifera*의 egg jelly에서 추출한 성분이 정자의 침체반응(acrosome reaction)과 히스톤 분해를 유도하고(7), 또한 난소에서 추출한 glycoside B₂는 난소의 성숙을 유도하는 세포분열을 저해한다는 보고(8)도 제시되었다. 스위스 연안의 불가사리인 *Porania puvillus*에서 추출한 polyhydroxylated steroidal glycosides(crossasteroside A)는 혈구응집반응을 유도하고 종양세포의 성장을 억제한다고 보고(9)되었고, *Mediaster murrayi*에서 분리한 steroid glycosides는 수정된 성체 알의 세포분열을 억제하고 용혈활성을 나타내며(10), *Certonardoa semiregularis*에서 분리한 saponins는 항바이러스 활성을 가진다고 보고(11)되었다. *Oreaster reticulatus*에서 분리된 sulfated steroidal glycoside인 asterosaponin P-1(12), *Nardoa novaecaledonia*와 *N. gomophia*에서 분리한 sulfated glycoside인 marthasteroside A, thornasteroside A와 halityloside I(13), 큰흑불가사리(*Protoreaster nodosus*)에서 분리한 toxin인 steroidal glycoside sulfate(nodososide)의 구조가 밝혀졌다(14,15).

국내에 서식하는 별불가사리(*Asterina pectinifera*)에 대

*Corresponding author. E mail: sungtae@sunchon.ac.kr
Phone: 82 61 750 3618, Fax: 82 61 750 3608

해서는 난자 형성 과정 중 난모세포 표면의 미세구조 변화(16)와 성 성숙과 생식주기(17)에 대한 보고가 있다. 그리고 평활근 이완 활성 펩타이드를 정제하여 활성을 보고(18)하였지만 대부분 불가사리를 이용한 재활용으로 비료제조(19) 또는 칼슘성분 분리(20) 등에 대한 보고가 있다. 최근 국내에서도 불가사리를 이용한 항암제, 의약품 개발, 가축사료, 기능성 화장품 신소재로서 이용방안 등이 시도되고 있다. 불가사리의 피해를 줄이는 방법에는 여러 가지가 있겠지만, 본 실험은 불가사리에서 건강식품이나 의약품으로 이용 가능한 면역기능 조절물질을 탐색하여 불가사리의 효용 가치를 높여, 불가사리 퇴치와 새로운 기능성 천연물질 개발에 도움이 되도록 한다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 (주)대한바이오텍(충북 음성군)에서 특정 병원체부재(specific pathogen free) Balb/c 생쥐를 공급받아 실험동물 사육실에서 폴리카보네이트 사육상자(18×20 cm) 당 6개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 이들 생쥐는 2주일 간 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 생후 8~12주 사이의 생쥐를 실험에 사용하였다.

사용시약

세포배양에 필요한 배지 RPMI 1640와 배지에 첨가하는 항생제(antibiotic-antimycotic), FBS(fetal bovine serum)는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, 2-mercaptoethanol(2-ME), sodium bicarbonate(NaHCO₃), sulfanilamide와 N-1-naphthyl-ethylen-diamine은 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 또한 세포증식을 측정하는데 사용한 시약(Cell titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)과 RT-PCR에 사용한 reverse transcriptase, dNTP Mix, oligo(dT)primer, Taq DNA polymerase는 Promega(Madison, WI, USA) 제품을 사용하였고, cytokine 측정에 필요한 항체는 Pharmingen(San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였다.

불가사리 추출물 제조

불가사리의 추출물은 별불가사리(*Asterina pectinifera*)를 충분히 건조시키고 갈아서 분말로 만든 후, 인산식염수 완충액(PBS)을 넣고 80°C에서 한 시간 진탕 배양한 다음, 4°C에서 2,000×g(30 min) 속도로 원심분리하여 상정액을 회수하였고, 분리한 상정액을 다시 4°C에서 9,500×g(20 min) 속도로 원심 분리하였다. 분리한 상정액을 투석막에 넣어서 10배량의 인산식염수 완충액(PBS)으로 하룻밤 투석을 시키고, 필터(0.45 μm)를 통과시켜 최종 추출물을 얻었다. 일부 추출물은 아세톤으로 처리(추출물과 아세톤 비율은 1:2)하여 -20°C에서 30분간 침전시킨 후, 4°C에서 15,000×

g(10 min) 속도로 원심 분리하여 상정액을 제거하고, 남은 침전물을 충분히 건조시킨 다음에 인산식염수 완충액(PBS)에 회석하여 실험에 사용하였다. 모든 추출물은 110°C에서 충분히 건조시킨 후 건조중량을 측정하여 사용하였다.

LPS 농도 측정법

불가사리 추출물에 포함되어 있을지도 모르는 LPS의 양은 Amebocyte lysate assay(E-TOXATE, Amebocyte Lysate from *Limulus polyphemus*, Sigma Chemical Co.)로 측정하였다. LPS 농도의 측정 한계치는 10 pg/mL이었고, 실험에 사용한 추출물 속에는 측정 한계치 이하의 LPS가 들어 있는 것으로 나타났다.

비장세포 분리

면역세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 생쥐의 비장세포를 이용하였다. 먼저 생쥐의 비장을 분리한 다음, 편셋이나 메쉬를 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI 1640 배양액으로 3회 세척한 다음, 5×10⁶ cells/mL 농도가 되게 희석한 후 96 well plate에 well 당 100 μL씩 첨가하였다. 이때, 불가사리 추출물을 농도별로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 다음 세포증식을 측정하였다.

B세포 분리

위의 방법에서 분리한 비장세포를 10 mL의 10% FBS-RPMI 1640에 희석한 후, 40 μL anti-Thy1.2 mAb ascites를 넣고 4°C에서 60분간 incubation하였다. 그 후 4°C, 330×g에서 6분간 원심침전한 후에 5 mL의 10% FBS-RPMI 1640 배지에 희석하고, 250 μL rabbit complement를 첨가하여 37°C water bath에서 45분간 배양하였다. 그 다음 최소영양 배지(MEM)로 330×g에서 6분간 원심침전을 두 번 반복하고, 10% FBS-RPMI 1640 배지 500 μL에 희석하여 Sephadex G-10 column을 통과시켜서 B세포만을 순수 분리하였다.

세포증식 측정법

세포증식 측정은 Cell titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega: Madison, WI, USA)를 사용하였으며, 세포 배양액 100 μL에 15 μL씩 첨가하여 4~8 시간 동안 배양한 다음 Microplate reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)로 490 nm에서 O.D.값을 측정하여 증식정도를 측정하였다.

대식세포주 배양법

생쥐 단핵/대식세포 계열의 세포주인 RAW 264.7은 한국 세포주은행(서울대학교 의과대학 암연구소)에서 구입하였다. 세포배양은 RPMI 1640 배지에 NaHCO₃(2 g/L), 항생제(10,000 units/mL penicillin G sodium, 10,000 units/mL streptomycin sulfate, 25 μg/mL amphotericin B), 2-ME(50 μM), 10% FBS를 첨가한 것을 이용하였다.

Cytokine 분비량 측정

대조군으로 LPS와 Con A를 첨가하거나 또는 불가사리 추출물을 배양세포에 첨가하여 배양한 상정액을 24시간 후에 회수하여, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)로 상정액에 포함된 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α 의 양을 측정하였다. 즉, flat-bottomed microwell plate에 goat anti-mouse cytokine 1차 항체를 coating buffer(0.1 M NaHCO₃, pH 8.2)를 이용하여 4°C에서 overnight incubation한 후, 10% FBS-PBS용액으로 2시간 동안 상온에서 blocking하였다. 실험에서 채취한 배양 상정액을 적당한 비율로 희석하여 plate에 각각 넣어서, 실온에서 4시간 incubation시킨 후, biotinylated anti-cytokine 2차 항체를 첨가하였다. 그리고 avidin-conjugated alkaline phosphate를 넣고, 실온에서 1시간 incubation시키고, 기질로 p-nitrophenyl phosphate를 넣은 후 Microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사이토카인의 농도는 표준곡선을 이용하여 환산하였고 각종 사이토카인의 측정 한계치는 10 pg/mL이었다.

면역글로블린 농도 측정

대조군으로 LPS를 첨가하거나 또는 불가사리 추출물을 배양세포에 첨가하여 배양한 상정액을 48시간 후에 회수하여 ELISA로 상정액에 포함된 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 농도를 측정하였다. 이때 각종 면역 글로블린의 측정 한계치는 10 pg/mL이었다.

일산화질소 측정

안정된 nitric oxide 산화물인 NO₂ (nitrite)는 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. 대식세포주(RAW264.7)를 적당한 조건 하에서 48시간 배양한 배양 상정액을 96 well plate에 100 μ L씩 넣고 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthylethylenediamine in H₂O : 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄-1:1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, Microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 64 μ M에서부터 0.5 μ M까지 2배씩 희석하여 얻은 표준 곡선을 이용하여 계산하였다.

RT-PCR

대식세포에 대조군으로 LPS를 첨가하거나 불가사리 추출물과 함께 4시간 배양한 다음, 세포를 모아 원심분리하여 상정액을 제거하고, RNazol을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA 1 μ g을 75°C에서 5분간 변성시킨 후, dNTP(1 mM), oligo(dT)15(0.5 μ g), reverse transcriptase(15 U), RNase inhibitor(0.5 U), RT buffer, MgCl₂ (5 mM)와 DEPC 처리된 증류수로 최종 부피가 20 μ L가 되도록 하여, 42°C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하여 중합효소연쇄반응에 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 합성된 cDNA 2 μ L를 주형으로 iNOS, IL-6, GM-CSF, TNF- α , β -

actin의 sense primer와 antisense primer(15 pmol/ μ L), Tag polymerase(0.5 U), polymerase buffer와 DEPC 처리된 증류수로 최종 부피가 20 μ L 되도록 하여 predenaturation: 95°C, 5분, denaturation: 95°C, 1분, annealing: 55°C, 1분, elongation: 72°C, 1분을 35 cycle한 다음, postelongation을 72°C에서 5분하는 조건으로 수행하였다. 중합효소연쇄반응의 product는 2% agarose gel에 20 μ L씩 loading하여 100 V에서 40분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다. 각 primer의 염기서열은 아래와 같다.

iNOS	sense 5'-CAT GGC TTG CCC CTG GAA GTT TCT CAA AG-3'
	antisense 5'-GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG CCA TCG-3'
IL-6	sense 5'-TTC CTC TCT GCA AGA GAC T-3'
	antisense 5'-TGT ATC TCT CTG AAG GAC T-3'
GM-CSF	sense 5'-CCT ATC ACT GTC ACC CGG CCT TGG-3'
	antisense 5'-GTC CGT TTC CGG AGT TGG GGG GC-3'
TNF- α	sense 5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3'
	antisense 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'
β -actin	sense 5'-GTC GGC CGC TCT AGG CAC CA-3'
	antisense 5'-GGG GGA CTT GGG ATT CCG GT-3'

결과 및 고찰

비장세포의 증식반응

비장은 말초 림프기관으로, 주로 T세포, B세포 및 대식세포 등으로 구성되어 있으며, 외부 항원의 침입에 대해 T세포, B세포 및 대식세포는 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 유도한다. 따라서, 불가사리 추출물이 비장세포에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 모든 면역반응은 세포증식이 일어나는 것으로 시작하기 때문에, 불가사리 추출물이 비장세포의 증식에 미치는 효과를 측정하였다.

즉, 별불가사리의 추출물을 이용하여 생쥐 비장세포의 증식반응을 측정하였다. 분리된 비장세포를 microplate well 당 5×10^5 개씩 넣고 무처리 대조군과 T세포를 자극하는 Con A(1 μ g/mL), B세포를 자극하는 LPS(10 μ g/mL) 그리고 불가사리 추출물(1, 10, 100, 1000 μ g/mL)을 첨가하여 48시간 배양 후 증식반응을 측정하였다. 실험 결과, 분말 추출물을 투석한 추출물과 투석 후 아세톤으로 침전시킨 추출물이 비장세포의 증식을 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 투석한 추출물에서는 1, 10 μ g/mL와 같은 낮은 농도에서는 비장세포의 증식이 유도되지 않았지만, 100 μ g/mL 농도에서 가장 높은 증식반응을 유도하였고, 보다 높은 1,000 μ g/mL 농도

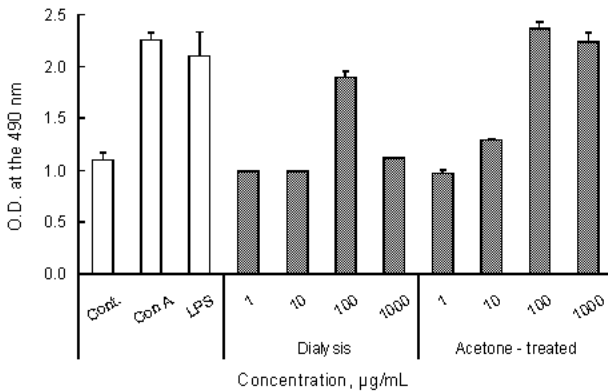


Fig. 1. The effect of starfish extracts on the proliferation of spleen cells.

The spleen cells (BALB/c, 5×10^5 cells/well) were stimulated with Con A (1 µg/mL), LPS (10 µg/mL) and starfish extracts at various concentrations for 48 hours.

에서는 오히려 증식반응이 억제되는 것으로 나타났다. 그러나 아세톤으로 침전시킨 추출물에서 10 µg/mL 농도에서 증식반응이 유도되기 시작하여, 100, 1,000 µg/mL 농도에서 최대 증식반응 유도효과가 나타났다.

이상의 결과로 별불가사리 추출물에 생쥐 비장세포를 증식시키는 물질이 포함되어 있다는 것을 알 수 있으며, 이 물질은 아세톤 처리로 침전시킬 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 이후 실험부터는 아세톤 처리로 침전시킨 추출물을 사용하였다.

비장세포의 사이토카인 생산 효과

비장세포의 증식반응이 일어나면, 증식하는 세포는 여러 가지 종류의 면역반응을 매개하는 사이토카인을 분비한다. 즉, 비장세포의 증식반응이 일어날 때 분비되는 사이토카인의 종류를 알면 사이토카인이 매개하는 면역반응과 증식하는 세포의 종류를 구분할 수 있다. 따라서 비장세포 증식반응이 일어날 때 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보았다.

분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여, 분리한 비장세포를 microplate well 당 5×10^6 개씩 넣고, 비장세포의 최대 증식반응을 유도하는 농도인 1,000 µg/mL를 첨가하여 24시간 배양한 후 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 배양 상층액에 포함되어 있는 사이토카인의 농도와 종류는 ELISA로 측정하였다. Table 1에 나타난 것과 같이, 비장세

포 중에서 B세포의 증식을 유도하는 LPS는 대조군에 비해 많은 양의 IL-6와 IFN-γ 생산을 유도하였고, T세포의 증식을 유도하는 Con A는 비교적 많은 양의 IL-2, IL-4, IFN-γ 분비를 유도하였다.

그리고, 별불가사리 추출물은 LPS와 같이 대조군에 비해 많은 양의 IL-6와 IFN-γ 생산을 유도하였다. 즉 무처리 대조군에 비해, IFN-γ 분비의 경우에 약 30배, IL-6 분비는 적어도 100배 이상의 많은 양을 분비하였다.

이상의 결과로 별불가사리 추출물은 비장세포를 직접 자극하여 IFN-γ 와 IL-6 분비를 유도하는 것으로 나타났다.

B세포의 증식반응

앞 실험에서 증식한 세포가 비장세포 중에서 어떤 종류의 세포인지를 확인하기 위해 먼저 B세포를 분리하여 별불가사리 추출물의 효과를 살펴보았다. T세포만이 가지고 있는 세포표면 특이 단백질인 Thy 1.2 항원에 대한 항체와 보체를 이용하여 T세포를 제거하고 나머지 부착성 세포들을 G-10 sephadex를 이용하여 제거한 다음, 순수한 B세포만을 분리하였다. 먼저, 분리한 B세포를 microplate well 당 3×10^5 개 또는 5×10^5 씩 넣고, 불가사리 추출물을 농도별로 첨가하여 2일간 배양하여 증식반응을 측정하였다. Fig. 2에 나타난 것과 같이, Con A에 의해서는 증식반응이 유도되지

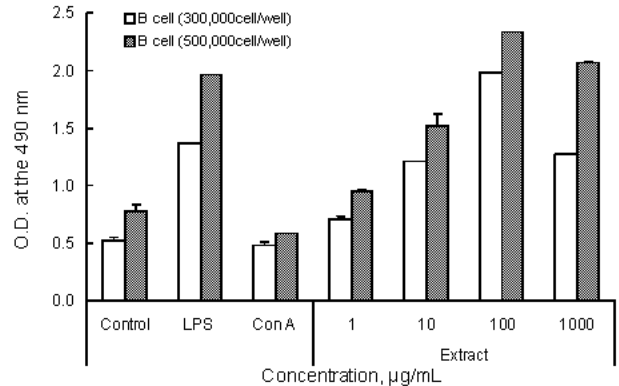


Fig. 2. The effect of starfish extracts on the proliferation of B cells.

The B cells (Balb/c, 3×10^5 or 5×10^5 cells/well) were stimulated with Con A (1 µg/mL), LPS (10 µg/mL) and starfish extracts for 48 hours. The spleen cells were treated with anti-Thy1.2 and rabbit complements and then passed through G-10 column. The passed cells were used as purified B cells in this experiment.

Table 1. Effect of starfish extracts on the production of various cytokines

Conditions	Cytokines (pg/mL)				
	IL 2	IL 4	IL 6	IL 10	IFN γ
Control	<10	<10	<10	<10	21.5±31.8
LPS (10 µg/mL)	12.1±0.9	<10	2002.5±81.3	40.6±1.0	781.5±95.5
Con A (1 µg/mL)	6420.4±230.7	92.6±7.9	737.5±10.6	12.0±1.0	19413.0±572.8
Starfish (1,000 µg/mL)	22.8±3.5	<10	1350.0±49.5	16.3±1.0	714.0±70.7

The Balb/c splenic cells (5×10^6 /well) were cultured with various stimulators for 24 hours, and the supernatants were assayed for cytokine activity. ELISA was used to quantitative levels of murine cytokines.

않고, LPS에 의해서만 증식반응이 유도되는 것으로 나타나 B세포가 순수하게 분리된 것을 알 수 있었다. 그리고 추출물을 첨가하였을 때, 높은 농도에서 뿐만 아니라 낮은 농도에서도 B세포의 증식이 유도되었다. 그리고 증식 정도는 B세포의 수가 많을수록 약간 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 순수 분리한 T세포에 추출물을 첨가하였을 때는 증식반응이 관찰되지 않았다(data not shown).

이상의 실험 결과로 별불가사리 추출물은 비장세포 중에서 B세포의 증식을 특이적으로 유도하는 것을 알 수 있었다.

면역글로블린 M 생산

면역세포 중에서 B세포는 외부에서 침입한 항원에 대해서 항체라고 하는 면역글로블린을 생산하여 체액성 면역반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서, B세포의 증식을 유도하는 것으로 확인된 별불가사리 추출물이 B세포의 면역글로블린 생산을 유도하는지를 확인하였다. 먼저, 별불가사리 추출물이 B세포를 자극하여 생산하는 IgM의 양을 측정하기 위해서, 추출물이 B세포의 최대 증식반응을 유도하는 농도인 1,000 µg/mL를 첨가하여 48시간 배양한 후 상층액을 회수하였다. 상층액에 포함된 IgM의 양을 ELISA방법으로 측정하였다. 실험 결과, 무처리 대조군에 비해 별불가사리 추출물을 첨가하였을 때 약 13배 정도의 IgM이 생산된 것을 알 수 있었다. 이 양은 B세포만을 특이적으로 자극하는 LPS에 의한 생산량보다 약 2배 이상 높게 나타났다(Table 2).

이상의 실험 결과로 별불가사리 추출물은 B세포의 증식뿐만 아니라 IgM의 생산도 유도하는 것을 알 수 있었다.

면역글로블린 G 생산

항원 자극시 처음에는 IgM 항체가 주로 생성되나, 항원

자극에 의해 B세포가 분화함에 따라 생성되는 항체의 형이 IgM에서 IgG, IgA 또는 IgE로 바뀌게 된다. 이러한 과정을 개별형 전환(isotype switching)이라 한다. B세포가 생산하는 항체 종류의 변화를 관찰하기 위해 IgG subclass인 G1, G2a, G2b, G3 각각의 농도를 측정하였다.

그 결과, IgG1은 별불가사리 추출물을 처리했을 때 무처리군에 비해 약 2배 이상 증가하였으며 그 정도는 LPS를 처리한 군과 비슷하였다. IgG2a는 별불가사리 추출물을 처리했을 때 무처리군에 비해 약간 증가했으며, IgG2b는 IgG1과 비슷한 양상을 보였다. 그리고 IgG3의 경우 무처리군은 거의 생산하지 않았으나, 별불가사리 추출물을 처리했을 때는 LPS보다 약 3배 이상 증가하였다(Table 3).

이상의 실험 결과로 별불가사리 추출물이 IgM의 생산을 유도하는 것뿐만 아니라 IgG subclasses로의 개별형 전환을 유도하는 것을 알 수 있었다.

대식세포주의 일산화질소 생산

대식세포에 의해 탐식된 박테리아는 대식세포 내 살균작용에 의해 죽고 분해된다. 이때 박테리아를 죽이기 위해 대식세포가 분비하는 물질은 여러 가지가 알려져 있지만, 그 중에서 최근에 밝혀진 것으로 일산화질소(nitric oxide)가 있다. 따라서 별불가사리 추출물이 대식세포의 일산화질소 생산에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다.

대식세포주(RAW264.7)를 micro-plate well 당 5×10⁴개씩 넣고, LPS(10 µg/mL) 또는 별불가사리 추출물을 농도별로 첨가하여 48시간 배양 후 배양 상층액을 얻어 상층액 중에 포함된 일산화질소의 산화된 형태인 NO₂의 농도를 Greiss반응을 이용하여 측정하였다. 실험 결과, 별불가사리 추출물을 첨가하였을 때 농도 의존적으로 무처리 대조군에 비해 현저히 많은 양의 일산화질소를 생산하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

이상의 결과로 별불가사리 추출물이 대식세포를 활성화시켜 일산화질소 생산을 직접적으로 유도하는 것으로 생각된다.

대식세포의 사이토카인 생산 효과

대식세포는 항원의 자극을 받아 활성화되면 IL-1β, IL-6, IL-12, GM-CSF 그리고 TNF-α 등을 분비하여 면역반응을 조절한다. IL-1β는 국소 염증반응을 매개하며 혈관 내피세

Table 2. Effect of starfish extracts on the IgM production of murine B cells

Conditions	Immunoglobulin M (ng/mL)
Control	23.4±0.2
LPS (10 µg/mL)	165.5±6.4
Starfish (1,000 µg/mL)	300.5±43.1

The purified B cells (Balb/c, 3×10⁵ cells/well) stimulated either in medium alone or in medium that contained LPS or starfish extracts for 48 hours, and supernatants were assayed for IgM level. ELISA was used to quantitative levels of murine IgM.

Table 3. Effect of starfish extracts on the production of IgG

Conditions	Immunoglobulin G (pg/mL)			
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Control	2088.9±15.7	3287.5±0.0	3600.0±424.3	<10
LPS (10 µg/mL)	4061.1±55.0	4662.5±353.6	5300.0±282.8	2450.0±0.0
Starfish (1,000 µg/mL)	4905.6±542.1	3662.5±176.8	5500.0±0.0	7116.7±471.4

The purified B cells (Balb/c, 3×10⁵ cells/well) stimulated either in medium alone or in medium that contained LPS or starfish extracts for 48 hours, and supernatants were assayed for IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 level. ELISA was used to quantitative levels of murine IgG subclass.

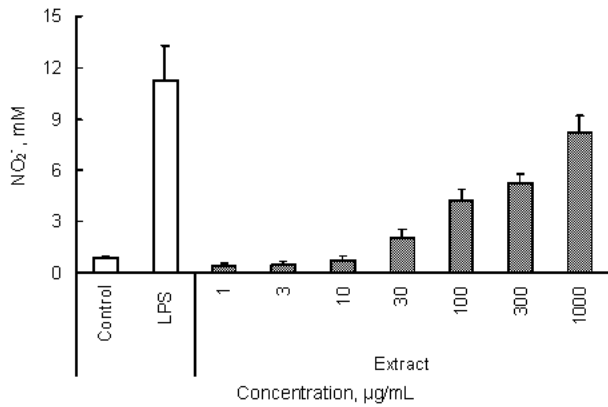


Fig. 3. Effect of starfish extracts on the production of nitric oxide.

RAW 264.7 (5×10^4 /well) were cultured either in medium alone or in medium that contained LPS (10 µg/mL) or starfish extracts for 48 hours.

포에 작용하여 백혈구의 부착을 매개하는 표면분자의 발현을 증가시키는 사이토카인이고, IL-6는 간세포가 피브리노젠과 같은 몇 가지 혈장단백질을 합성하도록 유도하며 B세포 분화를 활성화시키는 B세포 성장인자로 작용한다. IL-12는 NK 세포를 활성화시키는 인자이고, GM-CSF는 성장과 분화를 자극하며 TNF- α 는 종양괴사인자(tumor necrosis factor)로 알려진 물질로 종양세포를 파괴하는 사이토카인이다. 따라서, 별불가사리 추출물이 대식세포를 활성화시켜 이들 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다.

분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여, 배양한 대식세포주를 microplate well 당 5×10^5 개씩 넣고, 최대 일산화질소 생산을 유도하는 농도인 1,000 µg/mL를 첨가하여 24시간 배양한 후 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 배양 상층액에 포함되어 있는 사이토카인의 농도와 종류는 ELISA로 측정하였다. Table 4에 나타난 것과 같이, 대식세포를 활성화시키는 물질인 LPS에 의해서 IL-6, GM-CSF와 TNF- α 생산량이 무처리군에 비해 현저히 증가하였으며 별불가사리 추출물도 무처리 대조군에 비해 많은 양의 IL-6, GM-CSF와 TNF- α 생산을 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 별불가사리 추출물에 의해 유도된 대식세포의 GM-CSF와 TNF- α 생산량은 강력한 대식세포 활성물질인 LPS로 유도된 양과 비슷한 정도를 생산하였으며, IL-6는 약 50% 정도

생산하였다. 그러나, IL-1 β 와 IL-12는 생산하지 않았다.

이상의 결과로 별불가사리는 대식세포를 강력하게 활성화시켜 많은 양의 IL-6, GM-CSF와 TNF- α 생산을 유도하였으나 IL-1 β 와 IL-12의 생산은 유도하지 못하였다.

iNOS, IL-6, GM-CSF, 그리고 TNF- α 의 mRNA발현

일산화질소를 생성하는 효소인 iNOS(inducible nitric oxide synthetase), IL-6, GM-CSF, 그리고 TNF- α 의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR법을 이용하여 확인하였다.

별불가사리 추출물 1,000 µg/mL를 대식세포주 RAW 264.7와 함께 4시간 동안 배양한 후 total RNA를 추출하여 역전사 효소로 cDNA로 합성하고 primer를 이용하여 중합 효소연쇄반응(PCR)으로 mRNA 발현양을 증폭시켜 비교하였다. 그 결과, iNOS는 무처리군에서 발현되지 않았고 LPS를 처리한 군에서는 발현되었다. 그리고, 별불가사리 추출물을 처리한 실험군에서는 LPS를 처리한 군과 비슷한 정도의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

또한, 대식세포주 RAW 264.7가 분비하는 사이토카인인 IL-6, GM-CSF 그리고 TNF- α 의 mRNA발현 정도를 확인한 결과 iNOS와 같이 무처리군에서는 발현되지 않았으며 별불가사리 추출물을 처리한 실험군에서는 LPS를 처리한

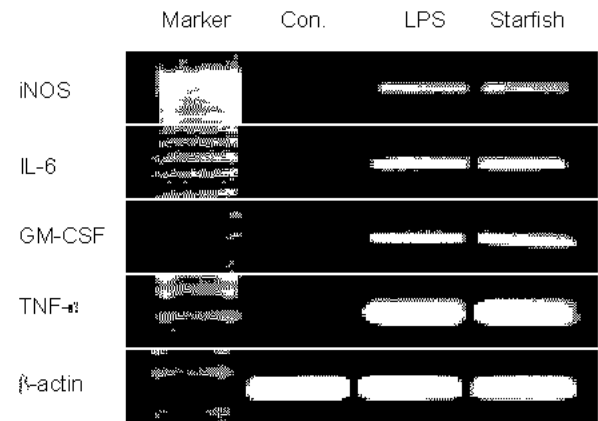


Fig. 4. RT-PCR analysis of iNOS, TNF- α , IL-6, and GM-CSF mRNA expression by macrophage cell line.

Total RNA was reverse transcribed to cDNA. Equivalent amounts of cDNA were amplified by PCR. The products were electrophoresed through 2% agarose gel containing ethidium bromide.

Table 4. Effect of starfish extracts on the secretion of IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF, and IL-12 and by murine macrophage cell line RAW 264.7

Conditions	Cytokines (pg/mL)				
	IL 1 β	IL 6	TNF α	GM CSF	IL 12
Control	<10	<10	48.6±30.3	33.8±5.3	<10
LPS (10 µg/mL)	29.3±2.3	4755.0±63.6	2391.4±394.0	323.8±1.8	<10
Starfish (1,000 µg/mL)	<10	2690.0±28.3	1898.6±262.6	303.8±1.8	<10

The RAW 264.7 cells (5×10^5 /well) were stimulated either in medium alone or in medium that contained LPS or starfish extracts for 24 hours, and supernatants were assayed for IL 1 β , IL 6, TNF α , GM CSF, and IL 2 activity. ELISA was used to quantitative levels of murine cytokine.

군과 비슷한 정도의 band를 확인할 수 있었다.

불가사리는 해양에서 패류를 포식하며 강한 생명력을 갖고 있어 바다의 양식어장과 많은 연근해 어장에서 커다란 피해를 주고 있는 생물로서 마땅한 천적이 없어서 날로 늘어나고 있는 실정이며 그 종류로는 별불가사리(*Asterina pectinifera*), 일본불가사리/일본불가사리(*Diatolasterias nipon*), 아무르불가사리(*Asterias amurensis*) 및 가시불가사리(*Marthasterias glacialis*) 등이 있다. 불가사리의 피해를 줄이는 방법에는 여러 가지가 있겠지만, 본 실험은 불가사리에서 건강식품이나 의약품으로 이용 가능한 면역기능 조절물질을 탐색하여 불가사리의 효용 가치를 높여, 불가사리 퇴치와 새로운 기능성 천연물질 개발에 도움이 되고자 하였다. 따라서 추가적인 실험을 계속하여, 면역반응을 조절하는 성분을 분리 정제하여 그 특성을 명확히 규명한다면, 각종 의약품이나 건강식품을 개발할 수 있는 원재료로서 별불가사리를 이용할 수 있기 때문에, 각종 패류나 연안동물을 잡아먹어 양식장에 큰 피해를 야기하는 불가사리의 퇴치에 큰 도움을 줄 것으로 생각된다.

요 약

불가사리 추출물을 이용하여 생쥐 비장에 있는 면역세포 활성화 효과에 대해 실험한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다. 첫째, 별불가사리 추출물 중에서 B세포와 대식세포를 활성화시키는 성분은 아세톤처리로 추출할 수 있었다. 둘째, 이 성분은 농도 의존적으로 생쥐 비장세포의 증식반응을 유도하였으며, IL-6와 IFN- γ 의 생산을 유도하였다. 셋째, 이 성분은 B세포의 증식을 유도하였으며, 이 때 면역글로불린 IgM과 IgG의 생산도 유도하였다. 넷째, 이 성분은 대식세포 주의 일산화질소 생산을 유도하였으며, 또 TNF- α , GM-CSF와 IL-6의 분비를 유도하였다. 이상의 실험 결과, 본 실험에서 사용한 별불가사리 추출물에는 B세포와 대식세포 같은 면역세포의 증식과 각종 사이토카인을 생산을 유도하여, 면역반응을 조절하는 성분이 포함되어 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구 개발사업(M2-0513000085-05B090008510)의 지원을 받아 수행하였기에 감사드립니다.

문 헌

1. Morin JG, Kastendiek JE, Harrington A, Davis N. 1985. Organization and patterns of interactions in a subtidal community on an exposed coast. *Mar Ecol Prog Ser* 27: 163-185.
 2. Zollo F, Finamore E, Minale L. 1987. Starfish saponins,

XXXI. Novel polyhydroxysteroids and steroidal glycosides from the starfish *Sphaerodiscus placenta*. *J Nat Prod* 50: 794-799.
 3. Minale L, Pizza C, Zollo F. 1982. 5 α -cholestane 3 β , 6 β , 15 α , 16 β , 26-penol: a polyhydroxylated sterol from the starfish *Hacelia attenuata*. *Tetrahedron Lett* 23: 1841-1844.
 4. Iorizzi M, Minale L. 1986. Starfish saponins, part 23. Steroidal glycosides from the starfish *Halityle regularis*. *J Nat Prod* 49: 67-78.
 5. Riccio R, Iorizzi M, Greco OS, Minale L. 1985. Starfish saponins, Part 22. Asterosaponins from the starfish *Halityle regularis*: a novel 22,23-epoxysteroidal glycoside sulfate. *J Nat Prod* 48: 756-765.
 6. Findlay JA, Agarwal VK, Monharir YE. 1984. On the saponins of the starfish *Asterias vulgaris*. *J Nat Prod* 47: 113-116.
 7. Amano T, Okita Y, Oknaga T, Matsui T, Nishiyama I, Hoshi M. 1992. Egg jelly components responsible for histone degradation and acrosome reaction in the starfish, *Asterina pectinifera*. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 274-278.
 8. Ikegame S, Okano K, Muragaki H. 1979. Structure of glycoside B₂, a steroidal saponin in the ovary of the starfish, *Asterias amurensis*. *Tetrahedron Lett* 20: 1769-1772.
 9. Andersson L, Nasir A, Bohlin L. 1987. Studies of swedish marine organisms, IX. Polyhydroxylated steroidal glycosides from the starfish *Porania pulvillus*. *J Nat Prod* 50: 944-947.
 10. Kicha AA, Kalinovskiy AI, Ivanchina NV, Stonik VA. 1999. New steroid glycosides from the deep water starfish *Mediaster murrayi*. *J Nat Prod* 62: 279-282.
 11. Wang W, Li F, Alam N, Liu Y, Hong J, Lee CK, Im KS, Jung JH. 2002. New saponins from the starfish *Certonardoa semiregularis*. *J Nat Prod* 65: 1649-1656.
 12. De Correa RS, Riccio R, Minale L. 1985. Starfish saponins, part 21. Steroidal glycosides from the starfish *Oreaster reticulatus*. *J Nat Prod* 48: 751-755.
 13. Riccio R, Greco OS, Minale L. 1986. Starfish saponins, part 28. Steroidal glycosides from pacific starfishes of the genus *Nardoa*. *J Nat Prod* 49: 1141-1143.
 14. Riccio R, Minale L, Pizza C, Zollo F, Pusset J. 1982. Starfish saponins. Part 8. Structure of nodoside, a novel type of steroidal glycoside from the starfish *Protoreaster nodosus*. *Tetrahedron Lett* 23: 2899-2902.
 15. Minale L, Pizza C, Riccio R, Sorrentino C, Zollo F. 1984. Minor polyhydroxylated sterols from the starfish *Protoreaster nodosus*. *J Nat Prod* 47: 790-795.
 16. Lee YR, Han JW. 1994. Ultrastructural changes at the surfaces of oocytes during oogenesis of the starfish *Asterina pectinifera*. *Kor J Zool* 37: 203-212.
 17. Choi IY, Lee JS, Yoo MS. 2006. Sexual maturation and reproduction cycle of the bat star, *Asterina pectinifera*. *J Kor Fish Soc* 39: 27-34.
 18. Kim EJ, Kim CH, Go HJ, Kim IH, An SH, Song HY, Park HY, Yoon HD, Chang YC, Hong YK, Park NG. 2005. Purification and characterization of a novel neuropeptide with a smooth muscle relaxing activity from the starfish, *Asterina pectinifera*. *J Kor Fish Soc* 38: 148-152.
 19. Lee SH, Bae SK, Kim HT, Kim HJ, Kim JC. 2002. Synthesize of liquid fertilizer using starfish and effect of manufactured fertilizer on growth of lettuce. *J Korean Soc Waste Manag* 19: 648-655.
 20. Park HY. 2003. Development of industrialization technology with starfish. *Food Industry and Nutrition* 8: 18-22.

(2007년 1월 4일 접수; 2007년 3월 2일 채택)