

나노 입자 불가사리 펩타이드의 면역 활성 증진

정향숙^{1,2} · 오성호^{1,2} · 김승섭^{1,2} · 정명훈^{1,2} · 최운용^{1,2} · 서용창^{1,2} · 최근표³ · 김진철^{1,2,4} · 이현용^{1,2,4*}

¹강원대학교 생물소재공학과, ²강원대학교 의료 & 바이오신소재융복합사업단,
³강원도립대학 식품가공제과제빵과, ⁴강원대학교 생명공학연구소

Enhancement of Immune Activities of Peptides from *Asterias amurensis* Using a Nano-encapsulation Process

Hyang Suk Jeong^{1,2}, Sung Ho Oh^{1,2}, Seoung Seop Kim^{1,2}, Myoung Hoon Jeong^{1,2}, Woon Yong Choi^{1,2},
Yong Chang Seo^{1,2}, Geun Pyo Choi³, Jin Chul Kim^{1,2,4}, and Hyeon Yong Lee^{1,2,4*}

¹Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University

²Medical & Bio-material Research Center and Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University

³Department of Food Processing & Bakery, Gangwon Provincial University

⁴Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

Abstract Immuno-modulatory activities of peptides from *Asterias amurensis* were investigated using a nano-encapsulation process. The molecular weights of the peptides in the range of 5-7 kDa were separated using Sephadex G-75 gel filtration. Eighty-five percent of the nano-particles were in the 300 nm range using dynamic light scattering. The cytotoxicity of the *A. amurensis* nano-particles against CCD-986sk human dermal fibroblast cells was 11.64% after adding 1.0 mg/mL of the samples, which was lower than that from the control (13.28% collagen). The secretion of NO⁻ from macrophages was estimated as 40 μM after adding 1.0 mg/mL of gelatin nano-particles, which was higher than the others. Prostaglandin E₂ production from UV-induced human skin cells decreased greatly to 860 pg/mL after adding 1.0 mg/mL of the samples. Confocal microscopy revealed that nano-particles effectively penetrated the cells within 1 hour. From these results, we consider that nano-encapsulation of the peptides from *A. amurensis* can improve their biological functions.

Key words: *Asterias amurensis*, collagen, cytotoxicity, nitric oxide, prostaglandin E₂

서 론

지구 온난화의 영향으로 최근 우리나라 연안은 불가사리의 대량 번식으로 인해 몸살을 앓고 있다. 불가사리 1마리가 하루에 바지락 16개, 연간 5천 840여개를 먹어치우는 등의 심각한 생태계 파괴 문제가 대두되고 있는 것이다. 불가사리는 지구 모든 해양에 분포하는 특징을 가지며, 어류가 아닌 극피동물문에 속하는 해양 저서생물로서 전 세계 1,800여 현생 종이 보고되어 있고 우리나라 근해에도 200여종 이상이 서식하고 있다(1). 대부분의 종은 지름이 20-30 cm인데, 1 cm에 지나지 않는 것도 있고 거의 65 cm에 달하는 것도 있다. 불가사리가 속한 극피동물문은 통상 곱편과 몸통 부위로 나누어볼 수 있는데 이들의 활성성분이 몸통보다는 콜라겐이 많은 곱편에 있을 것으로 기대됨에 따라, 최근 이로부터 얻어지는 펩타이드 정제(2) 등에 대한 연구가 진행되고 있다. 관련 연구로 가다랑어 유래 저분자 펩타이드의 항산화활성

을 평가한 예가 있다(3). 일부에서 불가사리의 독성 저감 및 피부 주름 억제 활성 등의 생리활성을 바탕으로 펩타이드를 이용한 항장 소재에 관한 연구(4)가 진행된 바 있지만, 현재 불가사리 저분자화 콜라겐에 대한 연구가 미비한 실정이다.

한편, 인체의 내피세포는 인지질로 구성되어 있어 수용성 성분이 침투하기 어려운 구조로 되어 있다(5). 나노입자는 인체에 쉽게 침투할 수 있기 때문에 순환을 통하여 각기 다른 신체 부위로 전달되며, 특히 100-300 nm의 소수성 표면을 갖는 리포솜은 분자성 물질의 운반을 용이하게 하여 표피 세포에 대한 친화성이 증가하게 된다(6). 따라서 수용성 물질의 세포내 침투 효율 향상을 위해서 활성물질을 유상이 포함된 W/O형 리포솜으로 제조하고 이를 생체에 적용시켜 높은 침투력 및 생체활용성을 나타내고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다(7,8).

따라서 본 연구에서는 대량수확이 가능한 해양 생물인 불가사리의 산업적 활용의 일환으로 불가사리 체벽에 함유되어 있는 펩타이드가 가지는 면역 활성과 나노 입자화 기술을 접목해 탐색하고자 한다. 이에 생체활용성 증진효과 탐색을 위해 천연 면역 증진 효과가 기대되는 불가사리 유래 저분자 펩타이드 추출물을 기존의 피부에 바르는 소재 외에 식용 가능한 미용식품으로의 응용 가능성을 가지고 있는 젤라틴으로 나노입자로 제조하였다. 해양저서 생물류 유래 불가사리 곱편의 저분자화과 나노입자화를 통한 기능성 소재화 연구는 거의 전무한 실정으로 해양생물 연구의 기반 연구로서 작용할 것으로 기대된다.

*Corresponding author: Hyeon Yong Lee, Division of Biomaterials Engineering, Department of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea
Tel: 82-33-250-6455
Fax: 82-33-256-4819
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr
Received December 1, 2009; revised March 2, 2010;
accepted March 2, 2010

재료 및 방법

시료의 조제

본 실험에 사용한 불가사리는 우리나라 해안에서 가장 대표적 종인 *Asterias amurensis*로서 2008년 10월 강릉시 연안에서 채취한 것을 수세 후 잘라 동결 건조한 것을 사용하였다. 시료를 5 cm 크기로 나누어 내피부위가 잘 드러나도록 자른 뒤 찬물에 침지하였다가 3% H₂O₂, 0.1 N NaOH 용액에 20%(w/v)이 되도록 첨가하고 12시간 동안 진탕을 통해 비 콜라겐 물질을 제거하였다. 이를 다시 증류수에 증량대비 0.5%의 구연산과 비타민 C를 가용화하여 변성점 이하인 20°C에서 골편과 골편에 붙은 콜라겐만 남도록 하였다(9). 이때 비 콜라겐 물질의 제거 및 콜라겐 수율 증진을 위해 골편을 초음파 추출기(Ultrasonic extraction system, Asia Industry, Incheon, Korea)에 넣어 콜라겐 변성점 이하의 온도에서 40 kHz의 초음파로 1시간 동안 초음파 공정을 병행하였다. 초음파 공정 시 초음파로 인한 열 발생을 방지하기 위하여 실시간으로 온도를 확인하고 20°C를 넘지 않도록 하였다. 이후 collagenase(CO130, Sigma, St. Luis, MO, USA)를 증량 대비 0.1% 농도로 1시간 동안 처리하였다. 여과액의 부피를 줄이기 위하여 감압 농축 후, 동결건조기(Cleanvac 8B, Biotron, Bucheon, Korea)를 이용하여 -70°C, 0.1 torr에서 진공 동결건조하여 동해산 불가사리 유래 펩타이드 분말을 제조하였다(1).

저분자 펩타이드 분리

10³-10⁵ dalton의 분자량 부근을 용출할 수 있는 Sephadex G-75 (G-75-120, Sigma)로 여과하여 fraction 별로 구분한 불가사리 콜라겐 단백질은 MALDI-TOF MS(Voyager-DETM PRP, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA)를 이용하여 분자량을 확인하였다(1).

나노입자 제조 및 확인

불가사리 시료 50 mg을 1 mg/mL의 농도로 0.5% acetic acid에 녹인다. 둥근바닥플라스크에 정제된 젤라틴을 녹여 감압기를 사용해 multilayer를 형성시킨다. 완전히 건조되어 layer가 형성된 둥근바닥플라스크에 액상의 불가사리 추출시료를 넣고, 초음파 분산기를 이용하여 상온에서 2시간 동안 균질화시켜 수용성 나노입자를 제조하였다(10). 나노 입자의 확인을 위해 사용된 장치는 Transmission Electron Microscopy(TEM)이고, 나노 입자의 크기를 알아보기 위해서는 Dynamic Light Scattering(DLS, BENTHOS, USA) 장치를 사용하였다. TEM은 나노입자 한 개를 크게 확대하여 관찰하는 것도 가능하기 때문에 입자의 모양, 입자의 크기 등을 결정하는데 효과적으로 사용될 수 있다. TEM 사진을 찍기 위해서 phosphotungstic acid solution을 이용하여 negative staining을 하였다. 나노 입자가 충분히 염색이 된 후, formvar/carbon으로 코팅된 grid에 얇게 퍼서 말린 뒤 EF-TEM(LEO 912AB OMEGA, Carl Zeiss, Jena, Germany), 120 kV에서 관찰 하였다. 본 실험에서 불가사리 고유의 펩타이드는 *A. amurensis* peptide (AP)로, 초음파 공정을 통해 저분자화 한 불가사리 저분자 펩타이드는 low molecular AP(ALP)로, 젤라틴 제재로 포집한 불가사리 나노입자는 gelatine nano-encapsulated AP(ALPG)로 각각 표기하였다.

세포주 및 세포 생육 배지

세포배양에 필요한 배지로 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)를 사용하였고, 그 밖에 배양에 필요한 시약으로 HEPES

buffer(H4034, Sigma)와 fetal bovine serum(HYCLONE, SH30396, Logan, UT, USA), gentamycin sulfate(Sigma, G1264), trypsin-EDTA(GIBCO, 25200, Grand Island, NY, USA)를 사용하였다. 실험에 이용된 세포주는 인간 섬유아세포인 CCD986sk(human, skin fibroblast, 21947, KCLB, Daejeon, Korea)과 RAW264.7(mouse, macrophage, 40071, KCLB)이다. 세포는 모두 DMEM에서 10% heat-inactivated FBS(fetal bovine serum)로 적응시켜 배양하여 실험에 이용하였다.

정상세포 독성 측정

세포독성 측정을 위해서 SRB assay를 이용하였다. Sulforhodamine B(SRB) assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 CCD986sk의 농도를 10% heat-inactivated FBS media에서 4-5×10⁴ cells/mL로 96 well plate의 각 well에 100 μL씩 첨가하여 24시간 배양(37°C, 5% CO₂)한 후, 불가사리 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 100 μL씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) trichloroacetic acid(TCA)를 100 μL 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 100 μL씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4-5회 정도 세척, 건조시킨 후 10 mM Tris buffer 100 μL를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다(11).

Macrophage에서의 NO⁻ 생성능 측정

사용된 세포주는 마우스 유래 RAW 264.7 대식세포이며, 세포는 10% heat-inactivated bovine serum과 90% DMEM을 이용하여 24well plate에 4-5×10⁴ cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가하거나 첨가하지 않고 5% CO₂ incubator 안에서 37°C에서 48시간동안 배양하여 실험에 사용하였다. 대식세포에서 발생하는 nitric oxide의 양은 활성화된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitrite의 양을 microplate assay를 이용하여 정량함으로써 측정하였다. 먼저 시료를 처리하고 48시간 동안 세포를 배양하고 상등액 50 μL를 취하여 동일부피의 griess시약(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 0.25 μM에서부터 4 μM까지 DMEM 배지로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO⁻생성능의 음성 대조구 물질로는 LPS를 사용하였다(12).

면역 B 세포 생육도 측정

면역 실험에서의 세포주는 면역세포 생육 증진 효과를 알 수 있는 인간 면역 세포인 B cell(Raji, ATTC, Rockville, MD, USA)을 이용하여 검증하였으며 RPMI 1640배지에 10% heat-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였다. 세포의 생육은 10% heat-inactivated FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역기능 증강 효과는 6 well plate에 세포를 1.0×10⁴ cells/mL의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 6일 동안 배양하면서 매일 각 well의 cell을 hemocytometer로 세포 수를 측정하여 생육도를 측정하는 방법을 사용하였다(13).

PGE₂를 이용한 UV 억제 활성 측정

UV 조사는 cyclo-oxygenase-2(COX-2) enzyme의 양을 크게 변화시켜 높은 수준의 Prostaglandin E₂(PGE₂) 발현량을 나타낸다. 인간 섬유아세포인 CCD-986sk 세포를 10% heat-inactivated FBS와 DMEM에 현탁하여 1×10⁶ cells/mL로 조정 한 뒤 37°C, 습도 5%의 CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 사용하였다. 이 현탁액에 aspirin을 50 μM이 되도록 첨가하여 세포에 잔존하는 COX-2 효소의 활성을 비가역적으로 억제시켜 PGE₂ 양을 동일하게 조절하였다. 다음으로 세포 현탁액과 시료를 96 well 세포 배양관 각 well에 20 μL씩 첨가하고 37°C, 습도 5% CO₂ 배양기에서 UV filter(35W)를 이용하여 UVA(6.3 J/cm²)를 2시간 동안 조사하였다. 배양 후 세포를 well 바닥에 부착시키고, 부착된 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후, 표면에 남아 있는 세포를 실험에 사용하였다. PGE₂ Express EIA Short kit를 이용하였으며, 항 PGE₂ 항체가 부착되어 있는 plate의 각 well에 회수한 상층액과 함께 PGE₂-acetylcholinesterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 배양하고, 각 well에 남아있는 용액을 말끔히 털어낸 후, 0.05% tween 20-phosphate buffer solution으로 각 well을 5회 세척하고 Ellman 시약 200 μL를 각 well에 넣은 후 7시간 배양하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂를 표준품으로 검량선을 작성하여 각각의 시료를 처리한 배양액에서의 PGE₂ 생성량을 구하였다(14).

Confocal microscope 측정

나노시료 첨가에 의한 면역세포 B cell(Raji)의 분포양상을 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal laser scanning microscopy)을 통해 관찰하였다. 나노입자 제조를 위해 초음파 분산을 시작할 때, fluorescein isothiocyanate(FITC)를 넣어줌으로써 fluorescence tagging 염색을 하였다. 1 mL의 면역 B세포 2×10⁸ cells/mL을 CO₂ 농도 5%, 30°C의 incubator에서 배양한 후, FITC로 염색된 불가사리 젤라틴 나노시료(1 mg/mL) 100 μL와 1시간 동안 반응시켰다. 공초점 레이저 주사 현미경 LSM510 META NLO(Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany)으로 세포들을 관찰하였다(15).

통계처리

실험결과는 triplicate determinations에 의한 mean±SD로 표시했으며, 각 평균치 간의 차이는 ANOVA test에 의해 α=0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

분자량 측정

불가사리 저분자 펩타이드에 관한 연구는 기존의 불가사리가 우리나라 연안해수의 환경평가(16), 칼슘활용 기술 개발(17), 중금속 제거(18) 등 환경적인 면에서 연구되어 온 것과 비교해 불

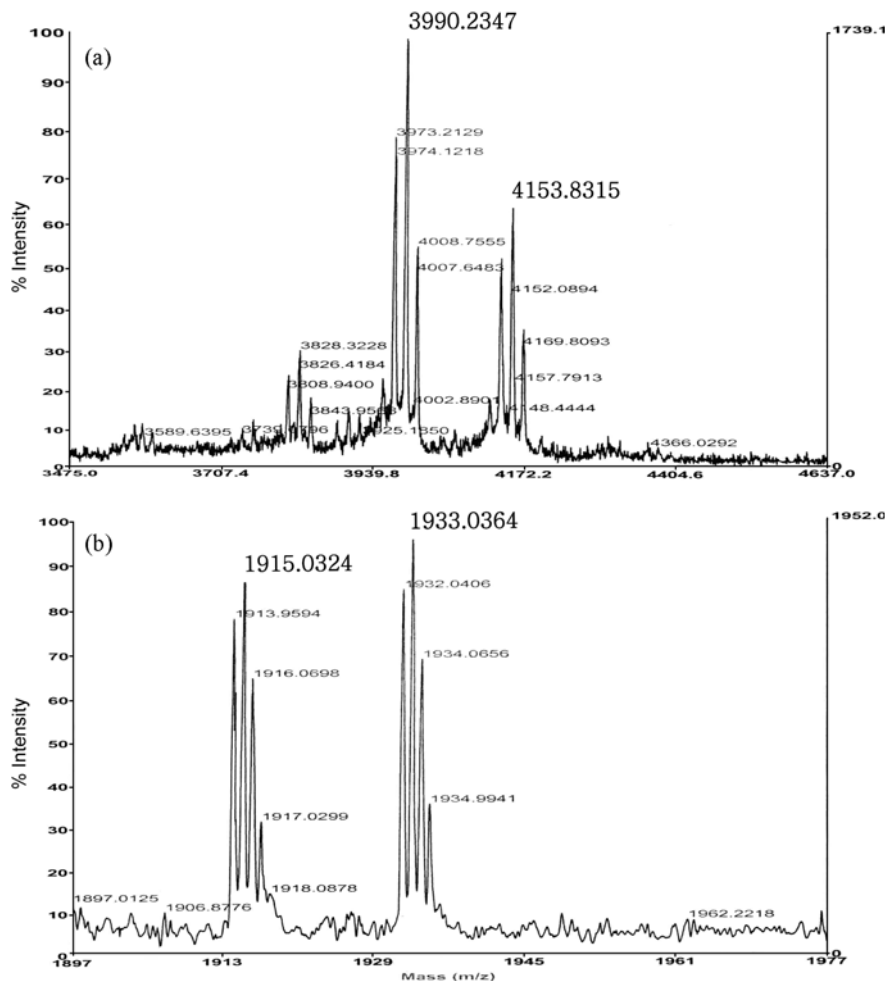


Fig. 1. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of light mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analyses of peptides isolated from *A. amurensis*. (a) Non-hydrolyzed collagen peptide of *A. amurensis* and (b) hydrolyzed collagen peptide of *A. amurensis*

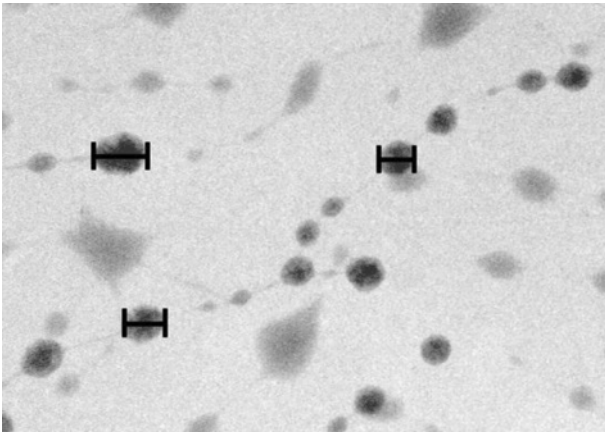


Fig. 2. TEM micrograph of nanoparticles from the *A. amurensis* peptide by the gelatine-encapsulation.

가사리의 향장 산업에서의 잠재적 부가 가치를 증진시킬 수 있는 의미 있는 연구라고 할 수 있다. 본 연구에서는 Sephadex G-75를 이용하여 수득한 총 100개의 fraction 중에서 fraction No. 25-30을 선택하여 실험에 사용하였다. 선택된 불가사리 fraction은 기존 연구결과(3)에서 세포 독성이 가장 낮고 UVA 처리 시 주름 발현 저해 효과가 가장 우수하게 나타난 범위의 fraction이며, 젤라틴으로 나노 입자화하여 면역 증진을 분석하기에 적합한 소재라고 생각되어 선택하였다. MALDI-TOF를 이용한 불가사리 콜라겐 펩타이드의 분자량 측정 결과는 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1의 (a)는 sephadex G-75로 분획한 fraction No. 25-30의 불가사리 콜라겐 펩타이드 고유의 분자량이고, (b)는 초음파 처리 후 중량 대비 0.1%의 collagenase를 1시간 동안 가하여 저분자화 한 불가사리 콜라겐 펩타이드의 분자량이다. 3번의 반복측정을 통해 안정적인 baseline을 가지는 peak를 얻었다. (a)의 분자량은 3990.23, 4153.83 m/z에서 주요 피크 분포를 보였고, (b)의 분자량은 1915.03, 1933.04 m/z에서 최대 피크를 보였다. 불가사리 콜라겐 펩타이드를 저분자화 했을 때 평균 2,000 m/z의 분자량이 감소했다. 이는 2개의 폴리펩티드 사슬이 peptide 결합으로 상호 결합되어 감겨 있던 콜라겐형구조가 collagenase의 작용으로 풀어진 후 효소의 영향을 받아 가수 분해 되었기 때문으로 사료된다.

나노입자의 확인

Fig. 2는 TEM으로 촬영한 젤라틴 구형 나노입자의 모습이다. 나노입자들은 negative staining에 의해 하얗게 보이는 구형으로 관찰되었다. 염색에 사용한 phosphotungstic acid는 수용성 부분을 염색시킨다. 그러므로 지질이 포함되어 있는 나노 리포솜 바깥부분은 염색이 되지 않아 하얗게 보인다. 제조된 나노입자는 수용성 추출물을 유상이 포집한 W/O 형태의 리포솜으로 구성된다. 이를 DLS로 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3과 같이 젤라틴으로 포집한 불가사리 저분자 펩타이드의 나노 입자 ALPG는 100-300 nm의 범위로 형성된 것을 알 수 있다. 본 논문에서는 나노 사이즈 시료의 세포 침투성 증진 효과를 가지는 것을 중점적으로 연구한 것이기 때문에 나노입자의 크기만을 측정하였으며, 불가사리 콜라겐 유래 펩타이드 나노입자의 DLS 측정치가 균일한 분포를 가짐으로써 안정성이 있다고 평가할 수 있다. 평균 200 nm인 피크와 크기를 고려한다면 제조된 나노입자는 생체에 효과적으로 흡수 가능한 제형이라고 생각된다.

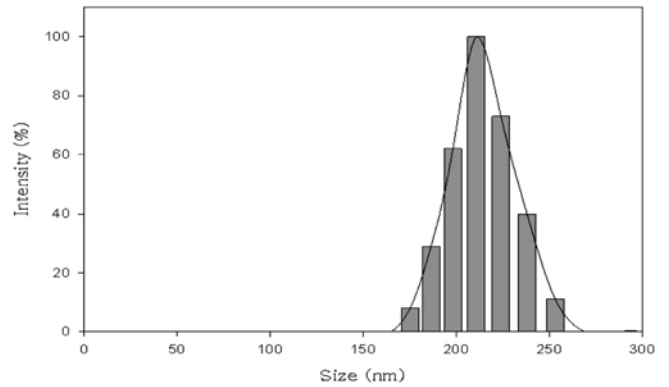


Fig. 3. Size distribution of nanoparticles with gelatine using dynamic light scattering (DLS).

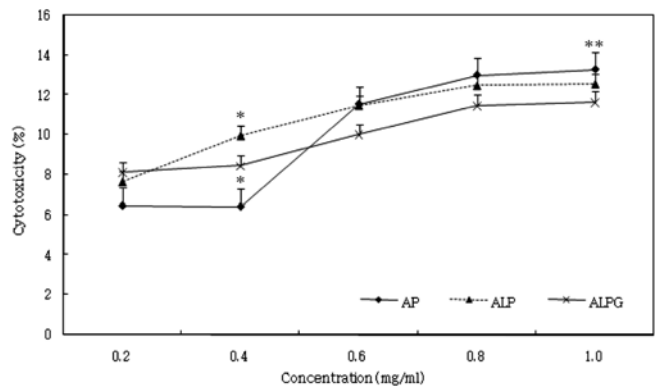


Fig. 4. Cytotoxicity of the nano-encapsulated peptides isolated from *A. amurensis*. AP, *A. amurensis* peptide; ALP, low molecular AP; ALPG, gelatine nano-encapsulated AP. *Significant differences between non-stimulated and stimulated samples at the 5% significance level. **Significant differences between non-stimulated and stimulated samples at the 1% significance level.

세포 독성 측정

Fig. 4는 인간 fibroblast에 AP, ALP와 동일하게 불가사리 펩타이드로 제조한 젤라틴 나노입자 ALPG를 0.2-1.0 mg/mL까지 다섯 가지 농도로 처리하고 48시간 동안 배양한 후, SRB 방법으로 측정된 세포독성이다. 결과에 나타난 바와 같이 대부분의 시료 농도 의존적으로 세포독성이 증가되는 양상을 나타냈으며, 최대 농도인 1.0 mg/mL에서 AP가 13.28%의 값을 나타내며 가장 높은 세포독성을 보였다. 반면 ALPG는 1.0 mg/mL의 농도에서 11.64%의 값을 나타내며 불가사리 콜라겐 유래 저분자 펩타이드의 세포독성보다 1.64%나 더 낮은 세포독성을 보였다(1). 이 값은 세포수준에서 콜라겐이 전혀 독성을 나타내지 않는 것으로 해석할 수 있으며 기존의 오징어 콜라겐의 세포독성 실험과 비교해, 콜라겐이 생체와 반응했을 때 면역학적으로 부작용이 적다는 것을 뒷받침하는 결과이다(19). 이처럼 불가사리 유래 저분자 펩타이드 시료 모두가 최고 농도인 1.0 mg/mL의 농도에서 10% 내외의 세포독성을 나타냄에 따라 불가사리 유래 펩타이드와 펩타이드의 젤라틴 나노입자화가 세포 수준에서 유의할만한 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다(20).

NO 생성능 측정

대식세포를 이용하여 NO⁻ 생성능을 확인한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 대식세포의 NOS(nitric oxide synthase)는 항상 존재하는

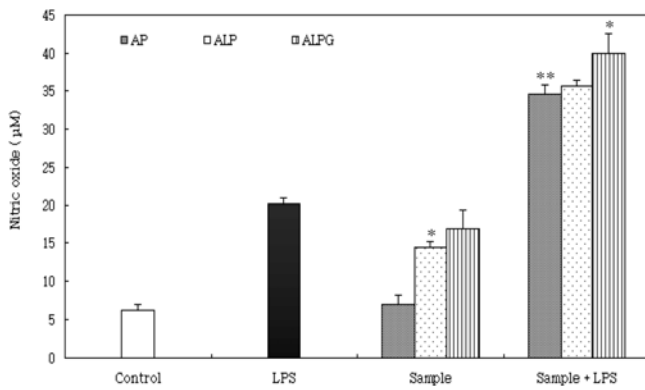


Fig. 5. Stimulation of nitric oxide production by adding the extracts from *A. amurensis*. AP, *A. amurensis* peptide; ALP, low molecular AP; ALPG, gelatine nano-encapsulated AP. *Significant differences between non-stimulated and stimulated samples at the 5% significance level. **Significant differences between non-stimulated and stimulated samples at the 1% significance level.

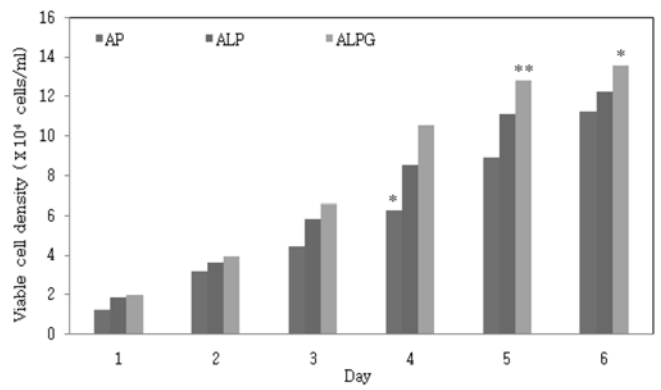


Fig. 6. B cell growth by adding 0.5 mg/mL of *A. amurensis*. AP, *A. amurensis* peptide; ALP, low molecular AP; ALPG, gelatine nano-encapsulated AP. *Significant differences between non-stimulated and stimulated samples at the 5% significance level. **Significant differences between non-stimulated and stimulated samples at the 1% significance level.

것이 아니라 TNF- α 와 같은 여러 가지 cytokine과 lipopolysaccharide (LPS, derived from *E. coli*)와 같은 세균 내 독소의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 이번 실험에서는 시료를 LPS와 같이 투여하여 NO⁻의 생성능을 확인하였다. 결과에서 알 수 있듯 LPS와 RAW 264.7 세포주에 시료를 처리하여 배양한 후 배양액 중에 NO⁻ 농도를 측정할 결과 아무처리도 하지 않은 대조군과 비교했을 때 각 시료의 NO⁻ 생산량에는 큰 변화를 관찰할 수 없었으나, 시료처리 후 높은 생성능을 확인하였다. 모든 추출물에서 높은 NO⁻ 생성율이 보여지고 있으며 특히 ALPG에서 가장 높은 40 μ M을 보여 주었다. 불가사리 콜라겐 유래 펩타이드를 젤라틴으로 나노입자화 했을 때 나노입자화하지 않은 경우보다 높은 NO⁻ 생성율이 나타났으며 이는 나노 입자화를 통해 불가사리 유래 면역성분 활성성분이 대식세포의 활성을 높인 것으로 생각된다. 또한 저온 추출의 경우 나노 입자 제조 공정이 병행된다면 일반의 추출공정보다 추가적인 면역 활성의 증진 가능성이 있다고 사료된다. Nitric oxide의 분비량은 곧 면역 물질의 분비량이므로, 불가사리 나노 입자 첨가군에서 NO⁻의 농도가 높게 나타남은 염증을 억제시키는 물질이 세포에서 효과적으로 작용함을 의미한다. 체내 염증을 억제시키는 물질이 세포 수준에서 효과적으로 작용하게 되어, 이후 실시한 PGE₂의 발현 또한 농도 의존적으로 낮게 나타났다.

시료첨가에 따른 B 세포 생육도 측정

Fig. 6은 인간의 면역체계에 항암에 중요한 역할을 하는 B cell에 대하여 불가사리 시료 첨가를 통해 생세포 생육도를 측정할 것이다. 시료 첨가 6일째에 나노 입자 시료가 보통 저분자 시료에 비해 평균 1.0×10^4 cells/mL 높은 13.54×10^4 cells/mL로 나타났다. 따라서 불가사리에는 면역세포의 생육을 증진 시키는 성분이 함유되어 있으며 콜라겐 펩타이드 상태에서는 비교적 낮은 생육을 보이지만 나노 제조 공정이 병행되면서 세포내의 침투가 용이해져 생육촉진을 높이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 세포내 투과 경로의 이점으로 인해 면역 세포 생육촉진이 가능해지는 것으로 사료된다. 불가사리 펩타이드 나노입자의 면역 증진 정도는 기존의 열수추출물에 비해 10% 이상 면역세포 생육 활성을 나타내는 것으로 알려진 병풀 나노입자의 기존 연구 결과와 비교해서 생육증진을 뚜렷이 확인할 수 있다(21).

PGE₂를 이용한 UV 억제 활성

UV를 이용하여 인간 fibroblast인 CCD-986sk를 자극함으로써 염증과 관련이 있는 PGE₂의 생성량을 측정할 결과는 Fig. 7의(A)와(B)에 나타내었다. Fig. 7의(A)는 UV를 조사하지 않은 세포에서의 PGE₂의 발현도를 나타낸 것으로, 나노 시료 첨가를 통한 PGE₂의 생성량은 보통 추출물 군에 비해 낮게 나타났으며 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보여 1.0 mg/mL의 농도에서 ALPG가 410 pg/mL로 가장 낮은 PGE₂ 생성량을 나타내었다. 이는 나노입자화 하기 전의 불가사리 콜라겐 유래 펩타이드의 PGE₂ 생성량인 553 pg/mL과 비교했을 때 의미가 있는 수치라고 할 수 있다(1). 또한 열매 복분자의 PGE₂ 생성량 510 pg/mL과 비교했을 때 불가사리 저분자 나노입자가 탁월한 항염증 효과를 가지고 있다고 할 수 있다(22). Fig. 7의 (B)는 UV를 조사한 세포에서의 PGE₂ 생성량을 나타낸 것으로, UV 비조사 조건에서와 마찬가지로 전반적으로 나노 시료 첨가를 통해 PGE₂의 생성량이 10% 이상 감소하였으며, 농도 의존적으로 낮아지는 경향을 나타내었다. 또한 UV 비조사 조건에서와 마찬가지로 1.0 mg/mL의 농도에서 ALPG가 860 pg/mL로 가장 낮은 PGE₂ 값을 나타내며 다른 농도에서도 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. 불가사리 콜라겐 유래 펩타이드를 젤라틴으로 나노입자화 함으로써 10-30%의 PGE₂ 생성을 낮춘 것은 불가사리가 가지고 있는 천연 면역 활성 증진 물질에 의한 효과라고 결론을 내릴 수 있다.

Confocal microscope 측정

Fig. 8은 confocal 현미경을 이용해 찍은 면역세포(Raji)의 사진으로서, 나타난 면역세포에서 불가사리 콜라겐 유래 펩타이드 나노 입자의 침투효과를 확인할 수 있다. 둥근 형태의 면역 B 세포가 형광으로 염색한 나노 시료 처리 1시간 후 나노 시료의 침투로 세포 내의 전반적인 변화가 생겼음을 확인하였다. 따라서 제조한 나노 시료의 경우 입자의 크기가 50-200nm로 분산됨에 따라 세포의 침투의 용이성이 일반 불가사리 펩타이드에 비해 뛰어난 것을 확인할 수 있다. 100 nm 이하의 소수성 표면을 갖는 리포솜은 추출물의 분자성 약물의 운반을 용이하게 하여 세포에 대한 친화성이 증가하게 된다. 불가사리와 같은 수용성 성분을 젤라틴과 같은 소재로 포집시킴으로써 인지질로 구성된 인체의 내피세포에 대해 수용성 물질의 세포내 침투 효율 향상시킬 수 있다.

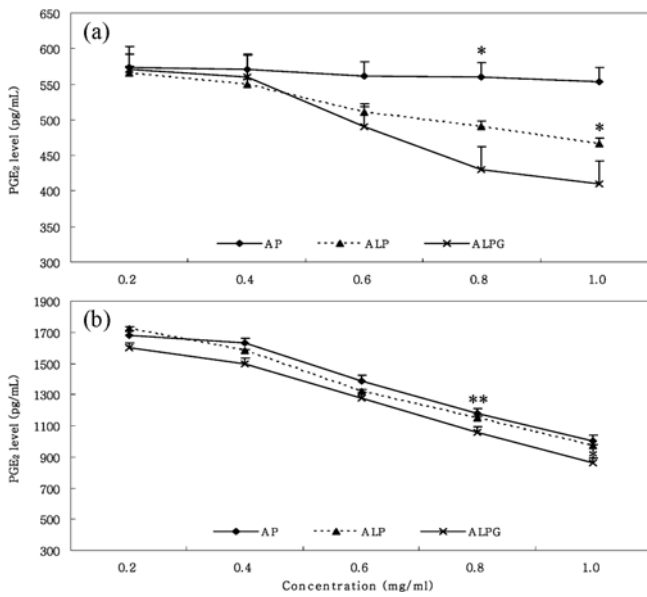


Fig. 7. Effect of nano-encapsulated *A. amurensis* on PGE₂ secretion of human fibroblast CCD-986sk by (a) Non-UV irradiation and (b) UV radiation. AP, *A. amurensis* peptide; ALP, low molecular AP; ALPG, gelatine nano-encapsulated AP. *Significant differences between non-stimulated and stimulated samples at the 5% significance level. **Significant differences between non-stimulated and stimulated samples at the 1% significance level.

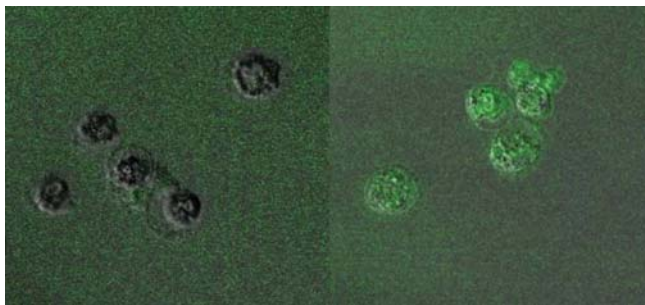


Fig. 8. Confocal microscope photographs of immune B cell (Raji) after 1 hr of growth in media containing nanoparticle of *A. amurensis*.

요약

본 연구는 기존의 불가사리 콜라겐 유래 펩타이드, 저분자화된 펩타이드, 저분자화된 펩타이드의 젤라틴 나노입자의 비교를 통해 면역 활성의 증진을 확인하였다. 불가사리 펩타이드는 Sephadex G-75 gel 크로마토그래피 분리를 통해 5-7 kDa 범위의 분자량 범위의 시료를 얻었고, MALDI-TOF MS 분석에 의해 펩타이드의 정확한 분자량을 측정하였다. 0.1% collagenase를 처리한 펩타이드의 분자량은 기존의 불가사리 콜라겐 유래 펩타이드에 비해 약 2,000 m/z까지 분자량이 감소되는 효과를 보였다. 이는 2개의 폴리펩티드결합으로 상호 결합되어 감겨있던 콜라겐형 구조가 collagenase의 작용으로 풀어진 후 효소의 영향을 받아 가수분해되었기 때문인 것으로 사료된다. 이후 20°C에서 젤라틴으로 시료를 나노입자화 하여 TEM 및 DLS로 분포와 크기를 각각 확인하였다. 이후 인간섬유아세포에 대한 세포독성 측정 결과, 나노입자화 한 ALPG가 최고 농도인 1.0 mg/mL의 농도에서 11.64%

로 가장 낮게 나타났다. 각 시료의 면역물질의 분비 정도를 확인하기 위해 macrophage에서의 NO⁻ 분비를 측정하였는데 역시 나노 입자화 한 ALPG가 40 μM로 가장 높은 NO⁻ 생성량을 보였다. 또한 불가사리 나노 시료가 저분자 추출물과 비교해 B cell 생육도를 10% 이상 향상시켰다. UV 자극에 의해 형성되는 염증 물질로 잘 알려진 prostaglandin의 생성을 정량하기 위해 PGE₂ 방법을 이용하였는데, 나노입자를 가해준 모든 군에서 농도 의존적으로 PGE₂의 생성이 감소하였고 역시 ALPG가 860 pg/mL로 PGE₂를 가장 적은 농도로 생성하였다. 마지막으로 confocal 현미경을 이용해 인간 면역 세포에 나노입자가 얼마나 효과적으로 침투하는지를 관찰하였는데 나노 시료의 경우 입자의 크기가 50-200 nm로 분산됨에 따라 일반 불가사리 펩타이드에 비해 세포 침투의 용이성이 크게 증진되는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 수산특정연구개발사업(과제번호: 2007017)의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과이며, 지원에 감사드립니다.

문헌

- Jeong HS, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jin L, Kim JC, Kwak HG, Hwang BY, Lee HY. Enhancement of skin immune activation effect of collagen peptides isolated from *Asterias amurensis*. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 522-527 (2008)
- Park HY, Lim CW, Kim YK, Choi TJ, Yoon HD, Lee KJ, Seo YK, Kim JY, Park KE. Effects of supplemental *Asterias amurensis* extract in the experimental diets on growth, blood chemistry, and superoxide production of kidney phagocytes of *Sebastes schlegelii*. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50: 362-366 (2007)
- Cheong HS. Antioxidant Effect of histidine containing low molecular weight peptide isolated from skipjack boiled extract. Korean J. Food Cookery Sci. 23: 221-226 (2007)
- Kwon MC, Kim CH, Kim HS, Syed AQ, Hwang BY, Lee HY. Anti-wrinkle activity of low molecular weight peptides derived from the collagen isolated from *Asterias amurensis*. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 625-629 (2007)
- Gilchrest BA. Skin aging and photoaging. J. Am. Acad. Dermatol. 21: 610-613 (1989)
- Rhaese S, Vonbriesen H, Rubsamens-Waigmann H, Kreuter J, Langer K. Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. J. Control. Release 92: 199-208 (2003)
- Jochen W, Paul T, Julian M. Functional materials in food nanotechnology. J. Food Sci. 71: 107-116 (2006)
- Kim YB, Shim SB. Study on characteristics and stability of nano-liposomes prepared by phospholipid classes. J. Korean Soc. Cosm. 14: 696-707 (2008)
- Park HY. Development of industrialization technology with starfish. Food Ind. Nutr. 8: 18-22 (2003)
- Kang KC, Lee CI, Pyo HB, Jeong NH. Preparation and characterization of nano-liposomes using phosphatidylcholine. J. Ind. Eng. Chem. 11: 847-851 (2005)
- Dol R, Peto R. The causes of cancer; quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J. Natl. Cancer I. 66: 1192-1308 (1981)
- Petra Z, Jan M, Barbora P, Hana K, Frantisek K, Martin F. Quantitative nitric oxide production by rat, bovine, and porcine macrophages. Nitric Oxide 19: 36-41 (2008)
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax moribifera* lev. Korean J. Med. Crop Sci. 10: 109-115 (2002)
- Park JH, Oh SM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Choe NH, Yoon Park JH, Kim JK. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus*

- coreanus* in murine macrophages. Biochem. Bioph. Res. Co. 351: 146-152 (2006)
15. Lee Genee Y, Kenny Paraic A, Lee Eva H, Bissell Mina J. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. Nat. Methods 4: 359-365 (2007)
 16. Yu CM, Wui IS, Lee JB. Quality evaluation of off-shore waters in Korea by bioassay using sea stars (*A. pectinifera*). Wonkwang J. Environ. Sci. 6: 29-37 (1997)
 17. Lee YS, Moon JY, Jang SJ, Park MN, Park HY. Effects of supplement agents enhancing calcium absorption on bioavailability calcium in rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 832-839 (2007)
 18. Hwang PG, Shin IS, Eu MC, Choi CH, Lee SM. Characteristics of heavy metal removal using iron-coated starfish. J. Korean Soc. Wat. Sci. Tech. 12: 19-26 (2004)
 19. Kwon MC, Syed AQ, Kim HS, Ahn JH, Cho NH, Lee HY. UV protection and whitening effects of collagen isolated from outer layer of the squid *todarodes pacificus*. J. Korean Fish. Soc. 41: 7-12 (2008)
 20. Ji LL, Chen Y and Wang ZT. The toxic effect of pyrrolizidine alkaloid clivorine on the human embryonic kidney 293 cells and its primary mechanism, Exp. Toxicol. Pathol. 60: 87-93 (2008)
 21. Ha JH, Kwon MC, Kim Y, Kim SS, Jeong MH, Hwang B, Lee HY. Enhancement of immuno-modulatory of *Centella asiatica* L. Urban with edible polymer through nano-encapsulation process. Korean J. Med. Crop Sci. 17: 257-265 (2009)
 22. Jeong HS, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Lee HY. Effects of *Rubus coreanus* extracts on ultraviolet-A irradiated cultured human skin fibroblasts. Korean J. Med. Crop Sci. 17: 321-327 (2009)