

RAW264.7 대식세포에서 팽생이 모자반 추출물의 면역활성 증진 효과*

김동섭¹ · 성낙윤¹ · 박상윤¹ · 김건¹ · 엄지¹ · 유진곤¹ · 서인라¹ · 한인준¹ · 조용백¹ · 김경아^{2†}
한국프라임제약(주)¹, 충남대학교 식품영양학과²

Immunomodulating activity of *Sargassum horneri* extracts in RAW264.7 macrophages*

Kim, Dong-Sub¹ · Sung, Nak-Yun¹ · Park, Sang-Yun¹ · Kim, Geon¹ · Eom, Ji¹ · Yoo, Jin-Gon¹ · Seo, In-Ra¹ · Han, In-Jun¹ · Cho, Young-Baik¹ · Kim, Kyung-Ah^{2†}

¹Division of Natural Product Research, Korea Prime Pharmacy CO., LTD., Jeonnam 58144, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

ABSTRACT

Purpose: *Sargassum horneri* (*S. horneri*) is a species of brown macroalgae that is common along the coast of Japan and Korea. The present study investigated the immuno-modulatory effects of different types of *S. horneri* extracts in RAW264.7 macrophages. **Methods:** *S. horneri* was extracted by three different methods, hot water extraction, 50% ethanol extraction, and supercritical fluid extraction. Cell viability was then measured by MTT assay, while the production levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and nitric oxide (NO) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and Griess assay, respectively. The expression and activation levels of inducible NO synthase (iNOS), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor κ B (NF- κ B) were examined by western blot analysis. **Results:** The three different *S. horneri* extracts were nontoxic against RAW 264.7 cells up to 50 μ g/mL, among which treatment with hot water extract (HWE) of *S. horneri* significantly enhanced the production of TNF- α , IL-6, and NO in a dose-dependent manner. Hot water extract of *S. horneri* also increased the expression level of iNOS, suggesting that up-regulation of iNOS expression by HWE of *S. horneri* was responsible for the induction of NO production. In addition, treatment of RAW 264.7 macrophages with HWE of *S. horneri* increased the phosphorylation levels of ERK, p38 and JNK. Furthermore, the activation and subsequent nuclear translocation of NF- κ B was enhanced upon treatment with HWE of *S. horneri*, indicating that HWE of *S. horneri* activates macrophages to secrete TNF- α , IL-6 and NO and induces iNOS expression via activation of the NF- κ B and MAPKs signaling pathways. **Conclusion:** Taken together, these findings suggest that HWE of *S. horneri* possesses potential as a functional food with immunomodulatory activity.

KEY WORDS: *Sargassum horneri*, macrophages, nitric oxide, cytokines, MAPKs

서 론

면역이란 외부 인자에 대한 생체의 방어 수단으로 인체의 면역계는 단핵구 (monocyte), 호중구 (neutrophile) 및 포식세포 (phagocyte) 등과 같은 다양한 면역세포들간의 상호작용에 의하여 그 체계가 유지된다. 이들 중 대식세포 (macrophage)는 외부 항원을 포식하고, 면역 조절인자인 nitric oxide (NO)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α),

Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 와 같은 염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)을 분비하여 자신의 포식작용을 증가시키거나 자연살해세포, 수지상세포 등의 선천면역의 활성을 유도하는 한편 외부 항원을 인식한 후 T 세포에 전달하여 세포의 활성화와 분화를 조절함으로써 적응면역의 활성화에도 기여하는 것으로 알려져 있다.¹⁻³ 따라서 인체의 면역기능 저하는 결국 감염 및 질병의 발생뿐만 아니라 중양의 발생 및 암환자의 회복을 지연시키는 요인이

Received: October 23, 2018 / Revised: November 21, 2018 / Accepted: December 10, 2018

* This work was supported by grants from the Ministry of Trade, Industry & Energy (MOTIE), Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT) through the Encouragement Program for The Industries of Economic Cooperation Region (P0000611).

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-42-821-6832, e-mail: kakim@cnu.ac.kr

© 2018 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되기도 한다.^{4,5} 이러한 관점에서 면역자극은 체내의 면역 방어체계 향상을 위한 중요한 전략으로 대두되고 있으며 최근 이러한 요구에 부응하여 면역 잠재력을 향상시킬 수 있는 천연물 및 식이소재 개발에 관심이 집중되고 있다. 또한 최근 연구에 의하면 천연물에서 추출한 다당류 및 단백질과 같은 고분자 물질들은 의약품에 비해 비교적 낮은 독성을 나타내는 장점을 가지고 있으며 생체 내에서 대식세포, 림프구, 자연살해세포 등 면역세포의 활성화를 통해 면역조절활성을 증진시킨다고 알려져 있다.^{3,5,6}

한편 해양에 서식하는 다양한 해양생물들 중 해조류는 다량의 무기질을 함유하고 있을 뿐만 아니라, 다당류의 함량이 높아 다양한 생리활성을 가지는 천연자원으로 그 중요성이 점차 주목 받고 있다.⁷ 그 중 모자반목 모자반과에 속하는 갈조류인 팽생이 모자반 (*Sargassum horneri*)은 우리나라 동해안과 남해안 및 일본의 전 연안과 중국에도 보편적으로 분포하는 종으로⁸⁻¹⁰ 우리나라에서 현재까지는 해안에 밀려와 쌓여 악취를 풍기는 원인으로써 사료로 이용되는 점 이외에는 해상에서 인간에게 피해를 입히는 해조류로 인식되고 있었다. 그러나 일본의 경우 오래 전부터 식용으로 이용되고 있는 것으로 보고되고 있으며¹¹ 해조류 추출물 및 이차대사물들이 가지는 건강증진효과로 인해 최근 들어 식단에서 주요식품의 한 급원으로 인식되기 시작하여 우리나라에서도 점차 팽생이 모자반의 건강기능성에 대한 연구가 활발해지고 있다.^{12,13} 팽생이 모자반에 대한 현재까지의 연구를 살펴보면, 팽생이 모자반 추출물이 골다공증 방지 기능이 있는 것으로 보고되어 있다.¹⁴ 또한 팽생이 모자반의 추출물이 항산화 및 항암효과를 가지며^{15,16} 헤르페스 바이러스 (Herpes simplex virus type 1)의 억제 효과가 있음이 보고되었다.¹⁰

본 연구에서는 RWA264.7 대식세포에 팽생이 모자반의 열수추출물, 주정추출물, 초임계추출물을 처리하여 이들이 세포생존, 사이토카인 및 NO 생성에 미치는 영향을 비교하는 한편 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호전달경로 및 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 활성화 등에 미치는 영향을 관찰함으로써 이들의 면역증강활성 및 분자적 작용기전을 규명하고, 면역증강 소재로서의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

연구방법

시료

본 연구에 사용한 팽생이 모자반은 전라남도 완도 일대에서 수거한 후 정수를 이용하여 침지 세척 및 자숙의 탈염과정을 거친 후 건조하여 수분함량이 10% 이하로 1차

가공된 건조 원물을 상온 보관하면서 본 실험에 추출용 시료로 사용하였다.

시약 및 항체

단백질 분석을 위하여 본 실험에 사용된 JNK, phosphate(p)-JNK, actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였고, iNOS 항체는 abcam (Cambridge, UK)에서 구입하여 사용하였고, p-p38, p38, ERK, p-ERK, I κ B, NF- κ B(p65), 및 β -actin 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, Ma, USA)에서 구입하여 사용하였다.

팽생이 모자반 열수 추출물의 제조

팽생이 모자반 열수추출물을 얻기 위하여 수분함량이 10%이하로 1차 가공된 팽생이 모자반 원물을 100 mm 수준으로 분쇄한 다음 시료 1 kg에 원물대비 30배에 상당한 정제수 30 L를 가하여 온도 90°C에서 4시간 동안 추출하였다. 팽생이 모자반 열수 추출물은 55 μ m의 백필터 (bag filter) 여과 후 원심박막농축기 (evaporator, CEP-LABO, Okawahara, Japan)를 이용하여 고형분 함량 20%brix가 되도록 농축하였고, 분무건조 (spray dryer, HKC-100-DJ, Niro, Denmark)한 것을 팽생이 모자반 열수추출물 (HWE)로 사용하였다.

팽생이 모자반 주정 추출물의 제조

팽생이 모자반의 주정 추출물을 얻기 위하여 50% 발효주정을 용매로 하여, 시료 1 kg에 용매 20 L를 가하여 4시간 동안 침지시켰다. 침지 후 55 μ m의 백필터 (bag filter) 여과 후 회전식 감압농축기 (evaporator, HS-20SP, Hahnshin S&T, Kim-po, Korea)를 이용, 80°C에서 농축물의 부피가 3L가 될 때까지 감압 농축한 후, 영하 80°C 이하에 동결건조 (freeze dryer, OPR-FDT-8650, Operon, Gyeonggi, Korea)하여 팽생이 모자반 주정 추출물 (EE)로 사용하였다.

팽생이 모자반 초임계 추출물의 제조

팽생이 모자반 초임계 추출물을 얻기 위하여, 용매는 이산화탄소로서 임계압력 73.76 bar과 임계온도 30.95°C 이상으로 액체와 기체의 확산계수와 점도, 밀도와 같은 물리화학적 특성을 모두 갖춘 초임계 이산화탄소 (supercritical carbon dioxide, Sc-CO₂)를 사용하였고 보조용매는 발효주정 (fermentation ethanol)을 사용하였다. 상기 건조된 팽생이 모자반 원물 60 kg을 2 mm의 입자크기로 분쇄한 후, 400 bar의 압력과 50°C의 온도로 설정하고 추출 보조용매로서 발효주정을 투입하였다. 이산화탄소와 보조용매의

공급은 각각 3 L/min과 0.3 L/min의 유량으로 설정하였다. 발효주정 주입 완료 후 120분 동안 이산화탄소만을 공급하여 400 bar의 등압 유지하여 총 4시간 30분 동안의 초임계추출 공정을 통해 팽생이 모자반 초임계 추출물을 수득하였다. 이후 회전식 감압농축기 (evaporator, HS-20SP, Hahnshin S&T, Korea)를 이용, 50°C에서 발효주정이 함유된 팽생이 모자반 초임계 추출물을 완전 농축하여 최종 팽생이 모자반 초임계 추출물 (SFE)로 사용하였다.

세포배양

한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 RAW264.7 마우스 대식세포를 분양 받아 100 unit/mL의 penicillin 및 streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

MTT assay

추출방법 별 팽생이 모자반 추출물의 처리에 따른 대식세포의 세포 생존율을 평가하기 위하여, RAW 264.7 cell을 96 well plate에 3×10^4 cell/well의 농도로 분주한 후 37°C, 5% incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, 팽생이 모자반 추출물 (HWE, EE, 및 SFE)을 각각 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, St Louis, MO)에 100 mg/mL의 농도로 용해하여 phosphate buffered saline (PBS; Welgene, Namcheon, Gyeongsan, Korea)에 희석하여 12.5, 25 및 50 µg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였다. Well당 20 µL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT; Sigma-Aldrich) MTT 용액 (1 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 시약의 첨가로 생긴 formazan을 녹이기 위해서 DMSO (Sigma-Aldrich)를 100 µL씩 첨가하고, 1시간 후 micro-plate reader (Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Control (medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

Nitric oxide (NO) assay

48 well plate에 RAW 264.7 cell을 5×10^4 cell/well로 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, PBS에 희석된 HWE, EE, 및 SFE 추출물을 각각 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/mL의 농도로 처리하였고, 양성대조군인 lipopolysa-

ccaride (LPS; Sigma-Aldrich) 또한 1 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 분리하였다. 분리된 배양 상등액 100 µL에 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.

사이토카인 분비 유도능 평가

48 well plate에 RAW 264.7 cell을 5×10^4 cell/well로 분주한 후, PBS에 희석된 HWE, EE, 및 SFE 추출물을 각각 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/mL의 농도로 처리하였고, 양성대조군인 LPS 또한 1 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 분리하였다. 분리된 배양 상등액 내 사이토카인 함량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 사이토카인의 농도는 kit에 포함되어 있는 표준용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

Western blot analysis

RAW 264.7 대식세포를 6 well plate에 1×10^6 cell/well로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고, PBS에 희석된 HWE 추출물을 12.5, 25 및 50 µg/mL의 농도로 처리하였고, 양성대조군인 LPS 또한 200 ng/mL 농도로 처리하였다. 30분 후 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 다음, NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 세포질과 핵 내의 단백질을 순차적으로 분리하였다. 분리된 단백질은 BCA protein detection kit (Thermo Scientific Inc. USA)을 사용하여 단백질 정량을 실시하였으며, well당 20 µg의 cell lysate를 10% polyacrylamide gel에 각각 loading하여 SDS-PAGE로 변성 분리하였다. 이를 poly-vinylidene difluoride membrane (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 transfer 하였고, membrane은 antibody의 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution (skim milk 5%) 20 mL에서 2시간 동안 방치하였다. 이후 TBST (20 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며, phosphate(p)-p38, p38, ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, IκB, 및 NF-κB의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체 (Cell signaling Technology, Danvers, MN, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 overnight 시키고, TBST로 10분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항체 (abcam, Cambridge, UK)를 1:5,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, TBST로 10분간 5회 세척하였으며, electrochemil-

uminescence (ECL; Millipore Merck KGaA) reagent를 이용하고, LAS-4000 (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA) 이미지 장치를 이용하여 분석하였다.

통계처리

실험 결과는 Statistical Package for the Social Sciences 141 (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 평균 (mean) ± 표준편차 (SD)로 나타냈다. 각 실험군의 분석 항목별 통계적 유의성은 Student's two tailed t-test 로 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 수준에서 비교하였다.

결 과

팽생이 모자반 추출물이 대식세포의 생존율에 미치는 영향

팽생이 모자반 추출물의 세포독성 여부를 평가하기 위하여 RAW264.7 대식세포에 3가지 서로 다른 추출물: 열수추출물 (HWE), 주정추출물 (EE), 초임계추출물 (SFE)을 각각 농도 별로 처리하여 24시간 배양한 후 MTT assay를 수행하였다 (Fig. 1). 팽생이 모자반 추출물을 처리하지 않고 배양한 음성 대조군 (CON)의 세포생존율 100%와 비교하였을 때 팽생이 모자반 추출물을 처리한 경우 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 생존율에 변화가 없거나 (SFE) 증가하는 것으로 나타나 (HWE, EE) RAW264.7 대식세포에 대한 팽생이 모자반 추출물의 세포독성은 없는 것으로 나타났다.

팽생이 모자반 추출물이 TNF- α 및 IL-6 생성에 미치는 영향

대식세포는 활성화되면 면역반응에서 보조인자로 중요한

역할을 하는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등과 같은 사이토카인을 분비하여 면역작용을 조절한다.¹⁷ 본 연구에서는 LPS를 처리한 군과 비교하여 LPS를 처리하지 않은 RAW264.7 세포에 팽생이 모자반 추출물을 처리할 때 선천성 면역을 활성화시킬 정도의 사이토카인 생성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 다양한 사이토카인들 중 TNF- α 와 IL-6의 생성 정도를 관찰하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 양성 대조군인 LPS를 처리할 경우 TNF- α 와 IL-6의 생성이 증가하는 것으로 관찰되었다. 한편, 팽생이 모자반 추출물 농도 별 (3.125, 6.25, 12.5, 25, 및 50 $\mu\text{g/mL}$)로 처리 시 열수추출물의 경우 대조군에 비해 TNF- α 와 IL-6의 생성이 유의성 있게 증가하여 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 경우 LPS처리군과 비슷한 수준을 보였으며 주정추출물의 경우 TNF- α 의 생성은 농도의존적으로 증가하였고 IL-6의 생성은 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의성 있게 증가하였다. 그러나 초임계추출물 처리 시 모든 농도에서 TNF- α 와 IL-6가 낮은 수준으로 검출되었다.

팽생이 모자반 추출물이 NO생성 및 iNOS발현에 미치는 영향

팽생이 모자반 추출물 처리가 대식세포 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 RAW264.7 세포에 3가지 서로 다른 추출물을 처리한 후 세포 상등액에서 NO의 생성 및 NO 생성에 관여하는 iNOS 발현 정도를 각각 Griess반응법과 Western blotting으로 조사하였다. 양성대조군인 LPS를 처리 시 NO 분비능이 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3A). 한편, 팽생이 모자반 열수추출물을 처리할 경우 농도의존적으로 NO의 발생이 증가하였으나 주정추출물과 초임계추출물 처리 시 NO의 발생을 관찰할 수 없었다. 또한 팽생이 모자반 열수추출물 처리 시 iNOS 발현

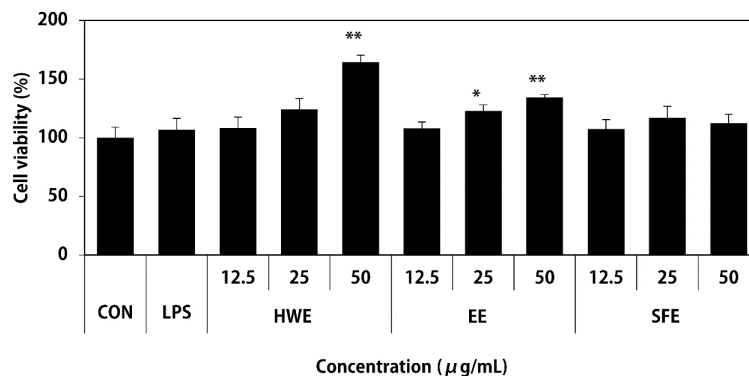


Fig. 1. Effects of different types of *Sargassum horneri* extracts on the cell viability of Raw264.7 macrophages. HWE, EE, and SFE were treated at the concentration of 12.5, 25, and 50 $\mu\text{g/mL}$ and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) used as a positive control. After 24 h, cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails t-test with a significant level of * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$ compared to control (CON) group. HWE, hot water extract; EE, ethanol extract; SFE, supercritical fluid extract

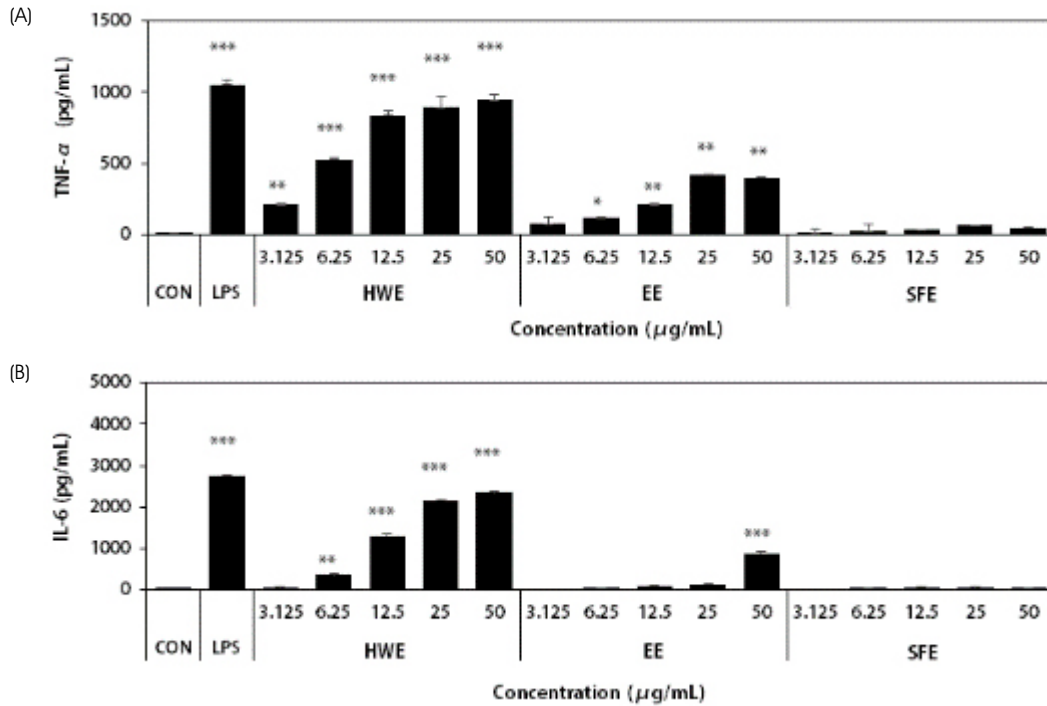


Fig. 2. Effects of different types of *Sargassum horneri* extracts on the production of TNF- α (A) and IL-6 (B) in Raw264.7 macrophages. HWE, EE, and SFE were treated at the concentration of 3.125, 6.25, 12.5, 25, and 50 $\mu\text{g/mL}$ in RAW 264.7 cells. LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) used as a positive control. After 24hr, cytokine productions in culture supernatant were investigated by using ELISA kits. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails t-test with a significant level of * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001, compared to control (CON) group. HWE, hot water extract; EE, ethanol extract; SFE, supercritical fluid extract

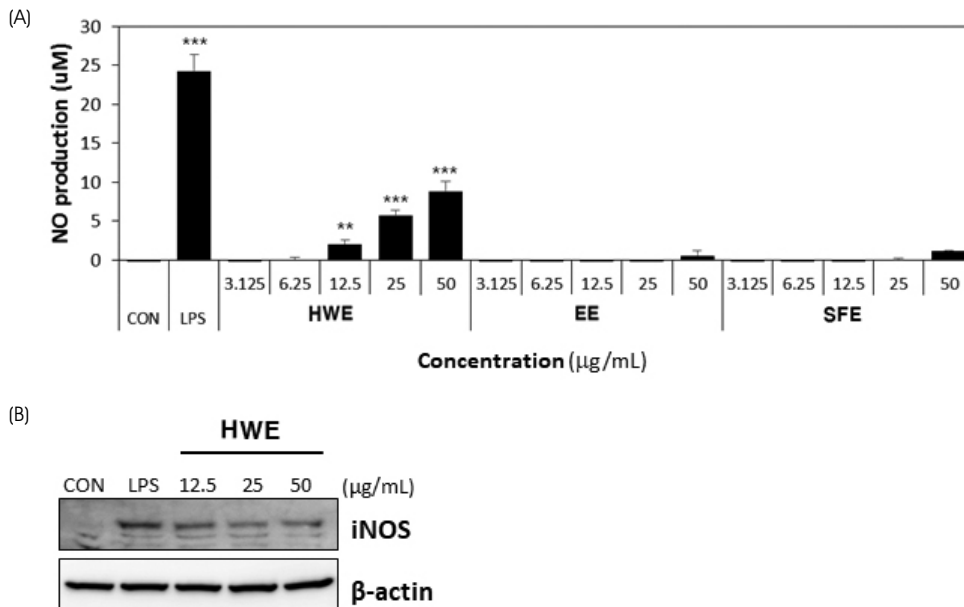


Fig. 3. Effects of different types of *Sargassum horneri* extracts on the production of NO (A) and iNOS expression level (B) in Raw264.7 macrophages. (A) Dose-dependent effect of HWE from *Sargassum horneri* (3.125, 6.25, 12.5, 25, and 50 $\mu\text{g/mL}$) on NO production was determined by Griess reagent assay. LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) used as a positive control. (B) Effect of HWE (12.5, 25, and 50 $\mu\text{g/mL}$) on iNOS expression in cell lysate was investigated by western blotting. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails t-test with a significant level of ** p < 0.01, and *** p < 0.001, compared to control (CON) group. HWE, hot water extract; EE, ethanol extract; SFE, supercritical fluid extract

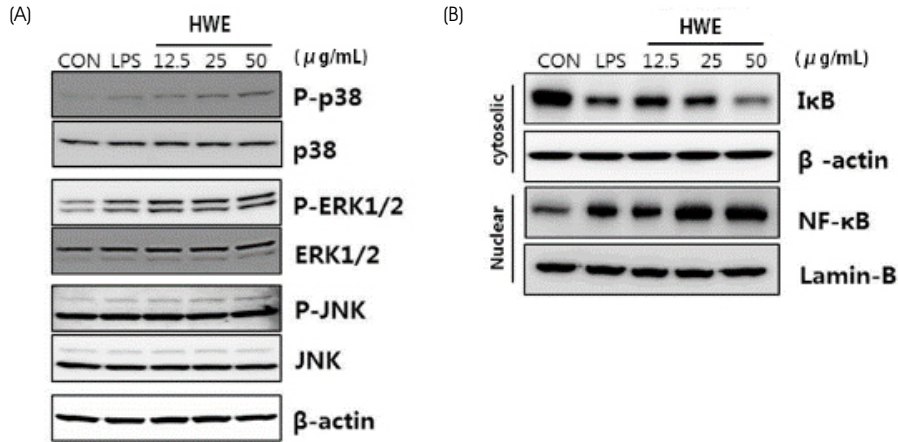


Fig. 4. Effects of hot water extract of *Sargassum horneri* on MAPKs phosphorylation (A), cytosolic IκB and nuclear NF-κB expression (B) in RAW 264.7 macrophages. HWE of *Sargassum horneri* was treated at the concentration of 12.5, 25, and 50 μg/mL for 30 min. LPS (0.2 μg/mL) used as a positive control. MAPKs phosphorylation, IκB and NF-κB expression were evaluated by western blot analysis using specific antibodies to p38, phospho-p38, ERK1/2, phospho-ERK1/2, JNK, phospho-JNK, IκB, NF-κB (p65). HWE, hot water extract

이 증가함을 보였고 이러한 결과는 팽생이 모자반 열수추출물이 iNOS 발현을 통하여 NO생성을 촉진하였음을 의미한다 (Fig. 3B). 이러한 결과로 미루어 3가지 팽생이 모자반 추출물 중 열수추출물의 처리가 세포독성 없이 다른 추출물에 비해 TNF-α와 IL-6의 생성을 증가시키는 한편 iNOS 발현을 통하여 NO생성을 촉진함으로써 면역활성에 기여하는 것으로 사료되며 이후 실험은 팽생이 모자반 열수추출물을 이용하여 수행하였다.

팽생이 모자반 열수추출물이 MAPKs 활성화 및 NF-κB 활성화에 미치는 영향

ERK1/2, JNK, p38과 같은 단백질을 포함하는 MAPKs 신호전달경로는 대식세포에서 TNF-α, IL-6와 같은 사이토카인의 생성뿐만 아니라 NO의 생성을 촉진하여 대식세포의 활성화에 중요한 역할을 하는 신호전달 경로이다.^{18,19} 이에 팽생이 모자반 열수추출물에 의한 면역활성화 효과의 분자적 기전을 조사하기 위하여 MAPKs 신호전달경로의 활성화와 팽생이 모자반 열수추출물 처리와의 연관성을 western blotting으로 관찰하였다. 팽생이 모자반 열수추출물을 처리한 경우 LPS 처리군과 유사하거나 그 이상의 수준으로 p38, ERK1/2, JNK의 인산화 정도가 농도의존적으로 증가하였다 (Fig. 4A). 또한 대식세포가 분비하는 사이토카인은 NF-κB 활성화에 의해서도 발현되므로 팽생이 모자반 열수추출물치리에 따른 NF-κB 단백질 발현 정도를 핵 내 단백질 fraction 및 세포질 내 단백질 fraction으로 각각 분류하여 알아본 결과 핵 내 단백질 fraction에서 NF-κB의 p65 단백질 발현은 팽생이 모자반 열수추출물 처리농도에 의존적으로 증가된 반면, 세포질 내 단백질 fraction

에서의 IκB 단백질 발현은 감소되는 것을 관찰하였다 (Fig. 4B). 이러한 결과는 팽생이 모자반 열수추출물이 세포질에 존재하는 NF-κB의 p65 단백질의 핵 내부로의 전이를 유도하여 NF-κB의 활성화를 유도함을 의미한다.

고 찰

대식세포는 감염원을 인식하는 초기의 면역세포로서 인체의 비특이적 방어체계인 내재면역뿐만 아니라 특이적 방어체계인 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다. 활성화된 대식세포에서 분비되는 대표적인 국소 단백질인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등과 같은 사이토카인은 세포의 성장 및 분화, 염증뿐만 아니라 면역반응 등의 역할을 담당하는 것으로 보고되어 있다. 특히 TNF-α는 미성숙 면역세포의 표면에 단백질 혹은 보조자극인자의 발현을 촉진하여 성숙된 형태의 세포로 전환시켜 암세포의 세포 용해를 유도함으로써 직접적으로 항암 작용을 나타내기도 하며 또한 항원에 오염된 세포의 살해능력을 증진시켜 초기 면역반응에 중요한 역할을 한다.^{20,21} IL-6는 면역반응 및 조혈작용을 조절에 관여하는 사이토카인으로서 B림프구 및 T림프구를 자극하여 항체생성을 증진하고 세포분화에 관여하는 사이토카인과 협동하여 상승작용을 나타내는 등 다양한 기능을 가진다.^{22,23} 한편, NO는 혈관의 항상성 유지, 신경전달 등과 같은 생리적으로 중요한 역할을 담당하고 있다. 과량의 NO는 정상세포를 공격하고 염증을 유도하여 독성을 갖는 염증질환의 매개인자로 알려져 있으나 활성화된 면역세포에서 분비되는 적절한 양의 NO는 면역

신호 전달자로서 면역세포를 활성화시켜 암세포에 대한 독성 및 외부 병원체로부터의 저항성을 증강시킨다고 알려져 있다.^{24,25} 따라서 TNF- α 및 IL-6와 같은 사이토카인의 발현과 NO 수준을 효과적으로 조절하는 것은 대식세포의 활성화를 통한 면역조절에 매우 중요하여 이에 대한 다양한 물질의 생리활성 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서 확인하였듯이 RAW264.7 대식세포에서 3가지 서로 다른 추출법에 따른 팽생이 모자반 추출물은 각기 다른 생리활성을 보였으며 그 중 열수추출물을 처리할 경우 TNF- α 와 IL-1 β 의 분비뿐만 아니라 iNOS 발현을 통한 NO 분비능이 다른 추출물에 비해 현저히 증가되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2와 3). 이는 팽생이 모자반 열수추출물이 대식세포의 사이토카인 분비능 조절뿐만 아니라 NO 분비 증가를 통한 면역세포를 활성화로 면역증진 활성을 가짐을 의미한다.

대식세포막에 존재하는 Toll-like receptor (TLR)는 병원성 미생물의 침입 시에 활성화되어 면역반응을 매개하는 수용체 단백질이며 특히 TLR4의 경우 LPS 등과 같은 특이적 리간드를 인식한 후 MAPKs 및 NF- κ B 등과 같은 세포 내부의 신호전달경로 활성화를 통해 다양한 전사인자들의 활성화 및 사이토카인의 발현을 촉진함으로써 효과적인 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다.²⁶⁻²⁹ MAPKs는 ERK1/2, JNK, p38과 같은 단백질을 포함하는 신호전달경로로서 대식세포에서 TNF- α , IL-6와 같은 사이토카인과 NO의 생성을 촉진하여 대식세포의 활성화에 중요한 역할을 하는 신호전달 경로이다.^{18,19} 또 다른 면역활성 신호전달 분자인 NF- κ B는 LPS의 자극에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF- α 등의 유전자발현에 중요한 조절자로 작용한다.³⁰ 본 연구에서는 팽생이 모자반 열수추출물에 의한 MAPKs 신호전달경로 단백질의 인산화 증가와 NF- κ B의 p65 단백질의 핵 내부로의 전이유도를 확인할 수 있었으며 (Fig. 4) 이러한 결과는 대식세포에서 팽생이 모자반 열수추출물에 의한 TNF- α , IL-6, NO 분비능 증가의 분자적 기전이 MAPKs 신호전달경로와 NF- κ B를 활성화함을 의미한다.

팽생이 모자반 추출물에 대한 선행연구에 의하면 팽생이 모자반 추출물이 특히 골다소에 동화작용을 하는 것으로 보고되어 있다. Yamaguchi의 연구에 의하면 팽생이 모자반 열수추출물은 in vivo와 in vitro에서 모두 골격의 칼슘보유 증가를 통해 골다공증 방지 기능이 있는 것으로 보고되어 있다.¹⁴ 또한 팽생이 모자반 열수추출물은 항산화 및 대장세포 등에서 항암효과를 가지며 특히 추출물 내 푸칸 설페이트 (fucan sulfate)가 헤르페스 바이러스 복제에 대한 억제효과를 가지고 있음이 보고되었다.^{10,15,16} 한편 팽생이 모자반 주정추출물의 경우 높은 농도 (200 μ g/mL)

에서 항염증 효과를 가지는 것으로 보고되었다.³¹ 그러나 팽생이 모자반 추출물의 면역증진 효능에 대한 연구는 현재까지 보고된 바가 없으며 본 연구에서 팽생이 모자반 추출물 중 열수추출물의 면역활성 증진 가능성을 처음 제시하였다. 향후 팽생이 모자반 열수추출물의 면역증진 활성이 추출물 내 어떠한 성분에 의한 것인지 규명하기 위하여 분리 및 정제과정을 통하여 추가적인 성분분석 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 모자반목 모자반과 갈조류인 팽생이 모자반의 3가지 서로 다른 추출물의 면역활성 가능성을 비교연구하기 위하여 RAW264.7 대식세포에 서로 다른 팽생이 모자반 추출물을 처리하여 TNF- α , IL-6 및 NO 분비능과 MAPK 신호전달경로 및 NF- κ B 활성화 수준을 측정하였다. 팽생이 모자반 열수추출물, 주정추출물, 그리고 초임계추출물 중 팽생이 모자반 열수추출물이 세포독성은 없는 농도 (50 μ g/mL)에서 TNF- α , IL-6의 생성뿐만 아니라 iNOS 활성화를 통한 NO 분비를 촉진하였다. 이러한 팽생이 모자반 열수추출물의 면역증진 효과는 MAPK 신호전달경로 및 NF- κ B 활성화를 통해 이루어지고 있음을 확인하였다. 본 연구결과는 팽생이 모자반 열수추출물의 면역활성 증진 가능성을 제시하여 향후 대식세포의 활성 유도를 통한 면역증진 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.

ORCID

김동섭: <https://orcid.org/0000-0002-6843-0360>

성낙윤: <https://orcid.org/0000-0002-7506-8697>

박상윤: <https://orcid.org/0000-0002-0668-1826>

김진: <https://orcid.org/0000-0002-5092-9665>

엄지: <https://orcid.org/0000-0001-8172-9546>

유진곤: <https://orcid.org/0000-0001-9561-6497>

서인라: <https://orcid.org/0000-0002-8847-2664>

한인준: <https://orcid.org/0000-0001-8706-8363>

조용백: <https://orcid.org/0000-0001-8772-1609>

김경아: <https://orcid.org/0000-0002-2611-3033>

References

1. Cha JH, Lim EM. Effects of Gardeniae fructus on cytokines in mouse macrophage. J Korean Obstet Gynecol 2014; 27(1): 1-16.

2. Erwig LP, Rees AJ. Macrophage activation and programming and its role for macrophage function in glomerular inflammation. *Kidney Blood Press Res* 1999; 22(1-2): 21-25.
3. Jiang MH, Zhu L, Jiang JG. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(12): 1367-1402.
4. Yuan H, Song J, Li X, Li N, Dai J. Immunomodulation and antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharides. *Cancer Lett* 2006; 243(2): 228-234.
5. Hong HD, Cho CW, Rhee YK, Choi HD, Lee HS. Status of technology development using immune-modulating polysaccharide. *Food Sci Ind* 2012; 45(1): 2-11.
6. Yan C, Yin Y, Zhang D, Yang W, Yu R. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide from *Taxus yunnanensis*. *Carbohydr Polym* 2013; 96(2): 389-395.
7. Brown ES, Allsopp PJ, Magee PJ, Gill CI, Nitecki S, Strain CR, McSorley EM. Seaweed and human health. *Nutr Rev* 2014; 72(3): 205-216.
8. Kim NG. Effects of temperature, photon irradiance, and photoperiod on the growth of embryos of *Sargassum horneri* in laboratory culture. *Korean J Fish Aquat Sci* 2015; 48(1): 76-81.
9. Liu L, Heinrich M, Myers S, Dworjanyn SA. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: a phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol* 2012; 142(3): 591-619.
10. Preeprame S, Hayashi K, Lee JB, Sankawa U, Hayashi T. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001; 49(4): 484-485.
11. Matsumura Y. Nutrition trends in Japan. *Asia Pac J Clin Nutr* 2001; 10 Suppl: S40-S47.
12. Food and Agriculture Organization of the United Nations (IT). A guide to the seaweed industry: FAO fisheries technical paper 441. 8. Seaweeds used as human food [Internet]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2003 [cited 2018 Dec. 16]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e0b.htm>.
13. Cardoso SM, Pereira OR, Seca AM, Pinto DC, Silva AM. Seaweeds as preventive agents for cardiovascular diseases: from nutrients to functional foods. *Mar Drugs* 2015; 13(11): 6838-6865.
14. Yamaguchi M. Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126(11): 1117-1137.
15. Shao P, Chen X, Sun P. Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*. *Carbohydr Polym* 2014; 105: 260-269.
16. Shao P, Liu J, Chen X, Fang Z, Sun P. Structural features and antitumor activity of a purified polysaccharide extracted from *Sargassum horneri*. *Int J Biol Macromol* 2015; 73: 124-130.
17. Yoshimura A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci* 2006; 97(6): 439-447.
18. Schorey JS, Cooper AM. Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiol* 2003; 5(3): 133-142.
19. Gaestel M, Mengel A, Bothe U, Asadullah K. Protein kinases as small molecule inhibitor targets in inflammation. *Curr Med Chem* 2007; 14(21): 2214-2234.
20. Yoon TJ. Effect of water extracts from root of *Taraxacum officinale* on innate and adaptive immune responses in mice. *Korean J Food Nutr* 2008; 21(3): 275-282.
21. Izadpanah K, Freyer D, Weber JR, Braun JS. Brain parenchymal TNF- α and IL-1 β induction in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol* 2014; 276(1-2): 104-111.
22. Byun EH. Comparison study of immunomodulatory activity of polysaccharide and ethanol extracted from *Sargassum fulvellum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2015; 44(11): 1621-1628.
23. Cha JH, Kim YS, Lee EM. Effects of *Prunellae spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J Orient Obstet Gynecol* 2010; 23(3): 91-100.
24. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 2001; 69(6): 625-635.
25. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157(1): 87-94.
26. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406(6797): 782-787.
27. Rosadini CV, Kagan JC. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr Opin Immunol* 2017; 44: 14-19.
28. Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* 2003; 24(7): 358-363.
29. Peralva MY, Boyd AC, Young JR, Smith AL. A critical role for MAPK signalling pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. *PLoS One* 2013; 8(2): e51243.
30. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640): 394-397.
31. Kim ME, Jung YC, Jung I, Lee HW, Youn HY, Lee JS. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract from *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via NF- κ B pathway regulation. *Immunol Invest* 2015; 44(2): 137-146.