

홍조류 유래 네오아가로올리고당의 면역 활성화 증강 효과

김경운 · 원지연* · 김은주** · 이제현*** · 이미연**** · †나득채*****

(주)온코인사이트 연구소장, * (주)온코인사이트 전임연구원, ** 다인바이오(주) 연구소장, *** 다인바이오(주) 대표이사,
**** (주)온코인사이트 부사장, ***** (주)온코인사이트 대표이사

Immune Enhancing Activity of Neoagarooligosaccharides from Marine Red Algae

Kyoung-Woon Kim, Ji-yeon Won*, Eun Joo Kim**, Je-Hyeon Lee***, Miyeon Lee**** and †Deukchae Na*****

Director of R&D Center, OncoInsight, Seoul 06349, Korea

*Associate Researcher, OncoInsight, Seoul 06349, Korea

**Director of R&D Center, Dyne Bio Inc., Seongnam 13209, Korea

***CEO, Dyne Bio Inc., Seongnam 13209, Korea

****Vice President, OncoInsight, Seoul 06349, Korea

*****CEO, OncoInsight, Seoul 06349, Korea

Abstract

Agar, a heterogeneous polymer of galactose, is the main component of the cell wall of marine red algae. It is well established as a safe, non-digestible carbohydrate in oriental countries. Neoagarooligosaccharides (NAOs) prepared by hydrolyzing agar by microbial β -agarase have been reported to show safety. However, their immunological effects have not been reported yet. Thus, the objective of this study was to investigate immune enhancing effects of neoagarooligosaccharides (NAOs) from marine red algae *Gelidium elegans* in mice by performing *ex vivo* experiments. Six-week-old mice were fed ad libitum. NAOs were orally administrated at three different concentrations (100, 500, and 2,500 mg/kg B.W./day) twice a week for four weeks. The group fed with NAOs at 2,500 mg/kg showed the highest proliferation of splenocytes and production levels of cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in the *ex vivo* experiment. In conclusion, NAOs can enhance immune function, increase proliferation of splenocytes, and increase cytokine production by activating macrophages in mice.

Key words: immunomodulating, splenocytes proliferation, cytokine, neoagarooligosaccharides from marine red algae

서론

소득 증대, 삶의 질 향상에 따른 식생활 문화의 변화, 인구 고령화에 따른 만성질환 증가와 질병예방 개념의 건강관리 체제의 도입 등으로 건강기능식품의 사회적 요구와 관심이 급등하여 천연물 유래의 안전한 소재를 응용한 질환들의 예방 및 치료를 위해 면역 활성화 증강 효과를 가진 기능성 식품 시장이 확대되고 있다(Kim 등 2008; Kim MH 2018; Jung 등 2019). 면역반응은 인체 내의 자기방어체제로 외부로부터 유입된 병원성 항원으로부터 우리 몸을 보호하기 위한 수단으

로 작용한다. 선천적 면역반응의 주요세포인 대식세포는 사이토카인인 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF- α), 인터루킨(interleukin-6; IL-6), IL-1 β 등을 분비하여 면역체계를 유지한다(Kim 등 2017). 천연물 유래 면역능에 관한 연구는 더덕물 추출물이 홍선세포 증식을 촉진시키고, 복강 대식세포의 NO 생성을 억제시켜 면역 증강 효과의 가능성을 제시한 보고가 있다(Suh JS 1996). 또한, 옥수수과 더덕물 추출물이 비장세포 증식과 사이토카인 분비를 촉진시킨 효과에 대해 보고가 있다(Ryu HS 2011).

한천은 해양 홍조류 세포벽의 주요 다당류 성분이다. 한천

† Corresponding author: Deukchae Na, CEO, OncoInsight, Seoul 06349, Korea. Tel: +82-2-2088-0094, Fax: +82-504-334-6197, E-mail: dc.na@oncoinsight.co.kr

은 미국에서 “일반적으로 안전한 것으로 인정되는(GRAS; generally recognized as safe)” 식품 첨가물로 잘 확립되어 있으며, 다이어트 식품, 아이싱, 유약, 가공 치즈, 젤리 과자 및 마시멜로 또한 아가로스 겔 전기영동과 다양한 크로마토그래피 기술을 위한 미생물 배지에도 사용되어 왔다. 한천으로부터 제조된 올리고당의 여러 생물학적 기능이 보고되었다(Chi 등 2012). 예를 들어, 한천으로부터의 네오아가로올리고당(NAOs)은 아가로오스의 β -1,4 글리코시드 결합을 특별히 절단하는 β -아가라아제에 의해 생성된다(Groleau & Yaphe 1977). 대조적으로, α -아가라아제는 아가로오스의 α -1,3 결합을 절단하여 아가로올리고당(AOS)을 생성한다. 한천 유래 네오아가로올리고당(NAOs)은 본 연구진에 의해 간 지방증과 고콜레스테롤혈증을 억제한다는 것이 밝혀졌으며(Yang 등 2017), 다른 연구진에 의해 보습 및 미백 효과(Kobayashi 등 1997), 항비만(Ohta 등 2004; Hong 등 2017a), 항산화, 급성간 손상 억제효과(Chen 등 2006) 등 다양하게 알려져 있다. 따라서 네오아가로올리고당(NAOs)은 식품, 화장품 및 제약 산업에 잠재적으로 응용할 수 있다. 하지만 이러한 네오아가로올리고당(NAOs)의 연구 대부분이 항비만, 항산화에 관해 연구되어 있으며, 동물실험을 통한 네오아가로올리고당(NAOs)의 마우스 비장세포 증식능과 복강 대식세포 활성화에 미치는 효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

기존 네오아가로올리고당(NAOs)의 유전독성 테스트에서 돌연변이를 유발하지 않았다. 또한, 쥐 및 비글견 모델에서 급성, 14일 및 91일 반복 경구 투여 독성 시험에서 독성이 없었으며, 네오아가로올리고당(NAOs)에 대해 수컷 및 암컷 쥐 모두에 대해 5,000 mg/kg 체중/일까지 부작용이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 식품, 의약품 및 화장품에 사용할 수 있는 네오아가로올리고당(NAOs)의 안전성을 뒷받침한다(Hong 등 2017b). 본 연구에서는 독성시험에 근거한 안전성 기준인 네오아가로올리고당(NAOs)의 5,000 mg/kg 이하 농도에서 마우스 실험을 진행하여 네오아가로올리고당(NAOs)을 4주간, 주당 2회 경구 투여 후 마우스 생체 내에서 면역 활성을 확인하였다. 그 면역 활성 마커로 마우스 비장세포 분리 후 증식능과 복강 대식세포에서 분비되는 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성능을 측정하여 네오아가로올리고당(NAOs)이 마우스 면역능에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 추출 및 실험동물

네오아가로올리고당(NAOs)은 Dyne Bio Inc.(Korea)로부터 제공받아 사용하였다(Yang 등 2017). 제주산 우뚝가사리

(*Gelidium elegans*)를 정제수에 30분간 담근 후 추출기(Model F-1,500L/W-1200L, HS Tech Inc., Korea)를 이용하여 95°C에서 4시간 동안 추출하였다. 그런 다음 한천 용액에 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M22-2C43로부터 제조한 β -agarase(DagA. DyneBio. Inc., Korea)를 첨가하여 44~46°C에서 16시간 동안 효소 반응시킨 후 95±5°C에서 1시간 동안 실활하였다. 생성된 네오아가로올리고당(NAOs) 용액은 0.5 mm Wound filter (Polypropylene, HaniFT)로 여과한 후 65±5°C에서 약 5시간 20 brix 농도로 농축하였다. 본 연구에서는 농축액을 균질화기(Model CM 500, 제일 기계, Korea)를 이용하여 동결 건조하고 80 mesh 크기의 분말로 분쇄한 후 상온에서 최종 산물인 네오아가로올리고당(NAOs)을 보관하여 사용하였다(Temuujin 등 2011; Park 등 2014). 사용된 마우스는 6주령된 암컷 Balb/c mouse를 중앙실험동물(Seoul, Korea)로부터 구매하여 고휘사료와 물을 자유로이 공급하면서 7일 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후 사용하였다(Table 1).

2. 시약 및 배지

사용된 배지는 RPMI medium 1640과 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, Con A(concanavalin A), LPS(lipopolysaccharide), MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)의 시약은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA) 제품을 사용하였다.

3. 네오아가로올리고당(NAOs)의 투여

Ex vivo 실험에서는 네오아가로올리고당(NAOs)을 멸균된 증류수로 녹인 후 필요한 농도로 희석 후 사용하였다. 마우스를 대조군과 투여군으로 나누었으며, 대조군에는 생리식염수를, 투여군에는 NAOs을 각각 100 mg/kg BW, 500 mg/kg BW, 2,500 mg/kg BW 일주일에 2번, 4주간 경구 투여하였다(승인번호 CUMC-2019-0177-01).

Table 1. Conditions for animal breeding

	Animal
Strain	Balb/c mouse
Body weight	0.02 kg
Age	6 weeks old
Sex	Female
Temperature	20~26°C
Humidity	40~60%
Light	Every 12 hours (Light and dark cycle)
Noise	60 db or less
Feed and water	Free supply

4. 비장세포 분리

마우스 비장을 적출하여 10%의 FBS(Fetal bovine serum)과 항생제 페니실린과 스트렙토마이신(100 unit/mL, 100 µg/mL)을 함유한 RPMI 1640(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 배지로 재현탁하였다(Wan 등 2013).

5. 비장세포 증식능 측정

비장세포는 mitogen을 처리 또는 처리하지 않은 그룹으로 나누어, mitogen 처리하지 않은 군에는 PBS를 처리하였고, mitogen 처리군에는 Con A, 5 µg/mL 또는 LPS, 1 µg/mL의 농도로 처리하였고 24시간 후, MTT assay 용액을 각각의 well에 10 µL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 세포 증식능을 평가하였다(Ryu 등 2006).

6. 복강 대식세포의 분리 및 배양

마우스 실험 종료 3일전 각 군별로 마우스 복강 내에 4% thioglycollate(Sigma) 1.3 mL를 주사하여 모이게 한 후, *in vivo* 실험 중 마우스 복강 대식세포를 분리 및 배양하였다. 복강 내 대식세포를 추출하여 배양한 다음, 배양 상층액으로부터 분리되는 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비량을 측정하였다. 부착성 세포만을 얻은 후, 10%-FBS RPMI 1640에 대식세포를 활성화시키는 mitogen인 LPS, 1 µg/mL의 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator(Eppendorf)에서 24시간 배양하였다(Ryu 등 2006).

7. 마우스 복강 대식세포의 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성능

네오아가로올리고당(NAOs)을 경구 투여한 마우스의 복강 내 대식세포를 분리하여 배양시킨 다음 배양 상층액을 분리하여 IL-1 β (R&D system, Minneapolis, MN, USA), IL-6(R&D system), TNF- α (R&D system)의 생성량을 ELISA cytokine kit(R&D system)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)의 각 well에 monoclonal IL-1 β (R&D system), IL-6(R&D system), TNF- α (R&D systems) 항체를 각각 4 µg/mL로 well당 50 µL 넣고 4°C에서 밤새 반응시킨 다음, 차단용액(1% (w/v) BSA/PBS(Phosphate-Buffered Saline) 및 0.05%(v/v) tween 20/PBS)을 well당 200 µL 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 대조군으로는 recombinant murine IL-1 β (R&D system), IL-6(R&D system), TNF- α (R&D system)를 이용하여 각각 78 pg/mL 내지 5 ng/mL 농도를 측정하였다. 표준시료와 함께 측정할 분리한 배양 상층액을 well당 50 µL 첨가하고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 용기를 세척용액(0.05% (v/v) Tween 20/PBS)으로 4회 세척하고 biotinylated IL-1 β (R&D system), IL-6(R&D system),

TNF- α (R&D system) 항체를 200 ng/mL로 희석하여 well당 50 µL 첨가한 후, 실온에서 2시간 동안 반응시키고 세척 용액으로 4회 세척 후 streptavidin-HRP(Thermo Fisher Scientific) 용액을 30분간 실온에서 반응 후 TMB substrate (Thermo Fisher Scientific) 용액 100 µL를 첨가하여 30분간 반응 후 stop 용액을 가해 반응을 멈추었다. ELISA reader(BioTek Instruments, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard를 이용하여 각 well의 사이토카인 분비 농도를 계산하였다.

8. 통계분석

모든 연구 결과의 자료는 평균(mean) \pm 표준편차(SD)로 표시하였고 실험군간 평균의 차이는 one way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 유의성의 여부를 검정하였다. 모든 통계 분석은 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) 소프트웨어로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 네오아가로올리고당(NAOs)이 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향

비장은 외부 항원에 대하여 주요한 면역 반응을 관여하는 장기로서 림프구(B, T세포)의 성숙, 분화가 일어나는 주요 림프 기관이며 비장세포의 증식은 면역반응에서 매우 중요한 의미를 갖는다(Kang 등 2014). 또한, 비장세포에는 T세포, B세포, 대식세포 등의 다양한 면역 세포들이 존재하고 있으며, 면역 활성 효과를 관찰하기 위한 지표로 주로 이용된다(Ryu 등 2006; Ryu HS 2014). 따라서, 네오아가로올리고당(NAOs)의 투여가 마우스의 면역 활성 효과를 확인하기 위하여, 네오아가로올리고당(NAOs)을 100, 500, 2,500 mg/kg BW로 일주일에 2번, 4주간 경구 투여 후 마우스 비장세포의 증식능을 관찰하였다. 물과 식이는 자유롭게 공급하였으며, 실험 종료 후 군간의 체중 변화와 조직의 무게의 변화는 통계적으로 큰 차이는 없었다.

세포의 종류에 따라 mitogen은 다양하게 존재한다고 알려져 있으며(Mischell & Shiigi 1980), 비장세포 실험에서 대표적으로 사용하는 mitogen으로써 Con A는 T 세포를 자극하여 세포증식과 사이토카인의 생성을 증가시키며, LPS는 B세포를 자극하여 세포를 활성화시킨다고 알려져 있다(Kim 등 2010). 따라서 mitogen은 세포의 민감성을 증가시켜 세포활성 여부 판단을 분명하게 해 줄 수 있다.

기존 연구를 통해, 네오아가로올리고당(NAOs)이 최대 5,000 mg/kg BW/day의 Sprague Dawley[®]TM(SD)rats에게 시험 화합물을 14일 및 91일 반복 경구 투여한 결과 최대 5,000

mg/kg BW/day의 네오아가로올리고당(NAOs)이 독성 징후를 나타내지 않는 것으로 보고한 바 있다(Hong 등 2017b). 따라서, 본 연구에서는 네오아가로올리고당(NAOs)의 투여 농도를 각각 100 mg/kg BW, 500 mg/kg BW, 2,500 mg/kg BW씩 독성이 없는 농도로 일주일에 2번, 4주간 경구 투여하였다. 비장세포 증식능의 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 네오아가로올리고당(NAOs)을 경구 투여한 마우스 *ex vivo* 실험에서 mitogen 처리하지 않은 군에서 2,500 mg/kg BW(* p <0.01)의 농도에서만 비장세포 증식능이 증가하였으며, mitogen인 Con A 처리한 군은 500 mg/kg BW(** p <0.05) 과 2,500 mg/kg BW(* p <0.01)의 농도에서 비장세포 증식능이 유의하게 증가하였다. 체액성 면역과 관련이 있는 B 세포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 LPS 첨가시 2,500 mg/kg BW의 농도에서 비장세포 증식능이 유의하게 증가하였다(* p <0.05). 비장세포 증식능은 LPS와 Con A 첨가시에 네오아가로올리고당(NAOs) 농도에 따라 효과에 차이는 있었지만 네오아가로올리고당(NAOs) 농도가 증가함에 따라 비장세포 증식능도 증가되었으며, 네오아가로올리고당(NAOs) 2,500 μ g/mL 투여한 군에서는 LPS와 Con A의 두 조건에서 모두 통계적으로 의미있게 비장세포 증식능이 증가함을 보였다. 네오아가로올리고당(NAOs)은 비장세포 증식을 유도하며, 저농도보다는 고농도에서 촉진효과가 증가할 것으로 생각된다.

2. 네오아가로올리고당(NAOs)의 경구 투여후 마우스 복강 대식세포에서 사이토카인 분비능

대식세포는 외부 자극에 대해 염증반응, 면역, 숙주 방어와 조직회복에 중요한 역할을 한다. 이처럼 대식세포는 세포

활성 정도에 따라 염증을 유발 혹은 경감시키는 두 가지 측면을 가지고 있다(Ko & Pyo 2011). 사이토카인은 외부 항원 자극에 대하여 면역반응, 염증과정 등을 조절한다고 밝혀져 중요한 병리적인 현상을 조절한다고 알려졌다(Moon 등 1991). 그 중에서도 자극된 대식세포로부터 생성되는 대표적인 사이토카인으로 IL-1 β , TNF- α , IL-6가 알려져 있다(Nathan & Hibbs 1991). 본 실험에서는 네오아가로올리고당(NAOs)을 100 mg/kg BW, 500 mg/kg BW 또는 2,500 mg/kg BW로 경구 투여한 마우스로부터 복강 대식세포를 분리 후, 자극된 대식세포가 분비한 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 확인하였고, LPS(1 mg/mL)로 자극한 대식세포로부터 분비된 사이토카인을 측정함으로써 대식세포의 활성화 마커로 확인하였다.

1) IL-1 β 분비량

네오아가로올리고당(NAOs)을 경구 투여하였을 때 복강 대식세포 배양액의 IL-1 β 분비량은 ELISA 사이토카인 키트(R&D system, USA)를 이용하여 측정된 후 Fig. 2에 나타내었다. 일주일에 2번, 4주 투여군에서 LPS 무처리군의 경우, 100 mg/kg BW의 농도에서는 대조군(38.56 \pm 29.97 pg/mL)에 비해 52.80 \pm 17.27 pg/mL로 유의한 차이가 없었으며, 500 mg/kg BW과 2,500 mg/kg BW 농도에서 각각, 66.15 \pm 29.63 pg/mL(* p <0.01), 71.41 \pm 21.64 pg/mL(* p <0.05)로 유의한 차이를 보였으며, LPS를 처리한 경우 100 mg/kg BW의 농도에서 160.30 \pm 24.59 pg/mL로 통계적인 차이가 없었고, 500 mg/kg BW과 2,500 mg/kg BW의 농도에서는 대조군(144.58 \pm 25.52 pg/mL)에 비해 각각, 244.19 \pm 39.18 pg/mL(* p <0.05), 311.35 \pm 66.53 pg/mL(* p <0.05)로 나타났다. IL-1 β 은 T세포와 B세포를 자극하여 후

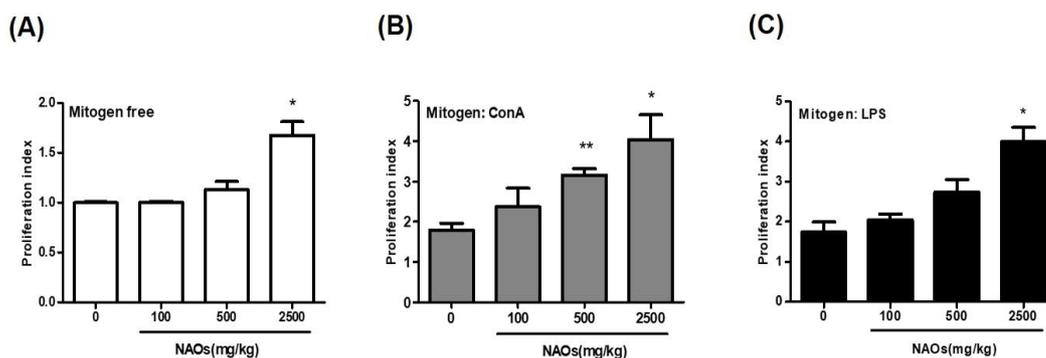


Fig. 1. Effect of orally administrated neoagarooligosaccharides from marine red algae on the splenocyte proliferation. NAOs was orally treated for 4 weeks (twice/week) at the concentration of 100, 500 or 2,500 mg/kg body weight. Isolated splenocytes were stimulated with mitogen (Con A; 5 mg/mL, LPS; 1 mg/mL) for 24hr. Cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as the mean \pm S.D. (n=4). Statistical analysis was performed using student's two tails *t*-test with a significant level of * p <0.05, ** p <0.01 compared to 0 (Control group). Proliferation index=mean of O.D. in test wells/mean of O.D. in control wells. NAOs; Neoagarooligosaccharides.

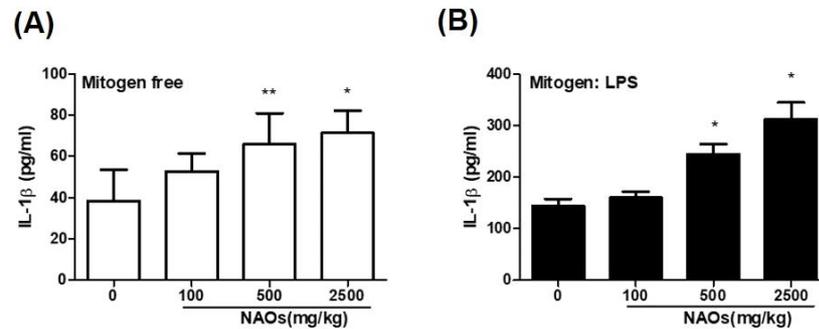


Fig. 2. IL-1 β production by activated peritoneal macrophages of mice orally administrated with neoagarooligosaccharides from marine red algae for 4 weeks. NAOs was orally treated for 4 weeks (twice/week) at the concentration of 100, 500 or 2,500 mg/kg body weight. Isolated peritoneal macrophages were stimulated with mitogen (LPS; 1 mg/mL) for 24 hr. The concentrations of IL-1 β were determined by triplicates cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D. (n=4). Statistical analysis was performed using student's two tails *t*-test with a significant level of **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to 0 (Control group). NAOs; Neoagarooligosaccharides.

천성 면역반응을 활성화시킨다고 알려져 있다(Byun EH 2017). 우리는 기존 연구에서 네오아가로올리고당(NAOs) 산물(DP6)에 의해 수지상 세포의 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α)을 촉진하여 성숙화함으로써 NK cell 등 면역세포를 활성화하고, 항종양 면역 반응을 증가시킴을 보고한 바 있다(Lee 등 2017). 따라서 본 실험의 네오아가로올리고당(NAOs)을 경구 투여한 마우스의 대식세포에서 IL-1 β 생성능이 대조군에 비해 통계적으로 의미있게 증가되어 네오아가로올리고당(NAOs)이 마우스의 복강 대식세포를 자극하여 IL-1 β 분비능을 촉진시킴으로써 면역 활성화 증강 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

2) IL-6 분비량

네오아가로올리고당(NAOs)을 경구 투여하였을 때 복강 대식세포 배양액의 IL-6 분비량은 ELISA 사이토카인 키트(R&D system, USA)로 측정된 후 Fig. 3에 나타내었다. 네오아가로올리고당(NAOs)을 일주일에 2번, 4주 투여군에서 LPS 무처리군의 경우, 모든 농도에서 대조군(89.91 \pm 30.00 pg/mL)에 비해 유의한 차이를 볼 수 없었고, LPS를 처리한 경우 100 mg/kg BW, 500 mg/kg BW와 2,500 mg/kg BW의 농도에서는 대조군(180.51 \pm 22.97 pg/mL)에 비해 각각, 222.65 \pm 9.72 pg/mL (**p*<0.05), 331.71 \pm 41.45 pg/mL(**p*<0.05), 349.84 \pm 35.34 pg/mL (***p*<0.01)로 나타났다. 이러한 결과에 비추어 볼 때 네오아가

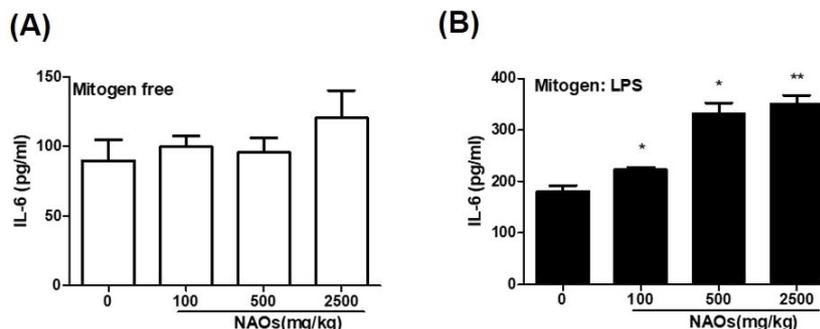


Fig. 3. IL-6 production by activated peritoneal macrophages of mice orally administrated with neoagarooligosaccharides from marine red algae for 4 weeks. NAOs was orally treated for 4 weeks (twice/week) at the concentration of 100, 500 or 2,500 mg/kg body weight. Isolated peritoneal macrophages were stimulated with mitogen (LPS; 1 mg/mL) for 24 hr. The concentrations of IL-6 were determined by triplicates cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D. (n=4). Statistical analysis was performed using student's two tails *t*-test with a significant level of **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to 0 (Control group). NAOs; Neoagarooligosaccharides.

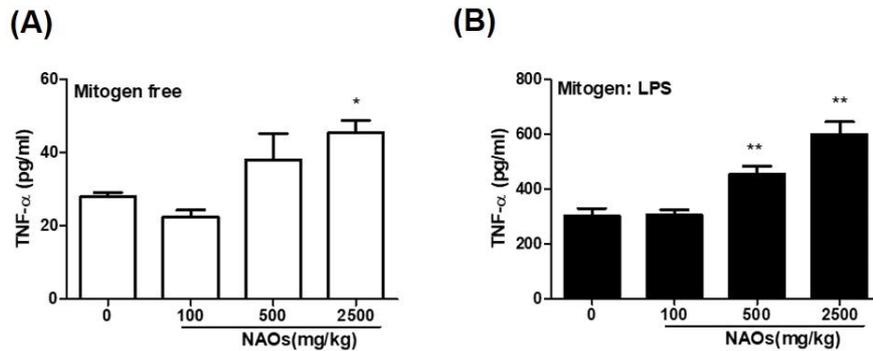


Fig. 4. TNF- α production by activated peritoneal macrophages of mice orally administrated with neogaroooligosaccharides from marine red algae for 4 weeks. NAOs was orally treated for 4 weeks (twice/week) at the concentration of 100, 500 or 2,500 mg/kg body weight. Isolated peritoneal macrophages were stimulated with mitogen (LPS; 1 mg/mL) for 24 hr. The concentrations of TNF- α were determined by triplicates cultured supernatant cells and values are mean \pm S.D. (n=4). Statistical analysis was performed using student's two tails *t*-test with a significant level of **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to 0 (Control group). NAOs; Neogaroooligosaccharides.

로올리고당(NAOs)이 마우스의 복강 대식세포를 자극하여 IL-6의 분비능을 촉진시킴으로써 면역 활성 증강 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

3) TNF- α 분비량

네오아가로올리고당(NAOs)을 경구 투여하였을 때 복강 대식세포 배양액의 TNF- α 분비량은 ELISA 사이토카인 키트 (R&D system, USA)로 측정된 후 Fig. 4에 나타내었다. 네오아가로올리고당(NAOs)을 일주일에 2번, 4주 투여군에서 LPS 무처리군의 경우, 100 mg/kg BW와 500 mg/kg BW의 농도에서는 대조군(27.95 \pm 2.33 pg/mL)에 비해 22.33 \pm 4.09 pg/mL, 38.06 \pm 14.1 pg/mL로 유의한 차이가 없었고, 2,500 mg/kg BW 농도에서만 45.45 \pm 6.66 pg/mL(**p*<0.05)로 유의한 차이를 보였으며, LPS를 처리한 경우 100 mg/kg BW의 농도에서 305.23 \pm 33.74 pg/mL로 통계적인 차이가 없었고, 500 mg/kg BW과 2,500 mg/kg BW의 농도에서는 대조군(302.38 \pm 51.64 pg/mL)에 비해 각각, 453.08 \pm 57.91 pg/mL(**p*<0.05), 598.85 \pm 90.80 pg/mL(**p*<0.05)로 나타났다. 이런 결과에 비추어 볼 때 네오아가로올리고당(NAOs)이 마우스의 복강 대식세포를 활성화시켜 TNF- α 의 생성을 촉진시킴으로써 면역 기능 활성화에 기여할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

요약 및 결론

대식세포는 선천성 면역에 관여하는 대표적인 탐식세포로서, 외부로부터 유입된 세균 및 바이러스와 같은 병원체를 직접 탐식하거나, 사이토카인과 같은 면역 물질을 분비함으

로써 면역반응을 유도한다(Byun & Byun 2015). 특히 활성화된 대식세포가 분비되는 IL-1 β , TNF- α , 및 IL-6 등의 사이토카인은 대식세포 뿐만 아니라 다른 세포도 활성화시키기 때문에 면역반응에서 매우 중요하다(Kim 등 2017). 본 연구는 천연자원인 식용 홍조류 유래 네오아가로올리고당(NAOs)의 면역증강 효과를 확인하고자 하였다. 네오아가로올리고당(NAOs)을 각각 100 mg/kg BW, 500 mg/kg BW, 2,500 mg/kg BW으로 일주일에 2번, 4주간 경구 투여 후 마우스의 복강 대식세포에서 분비되는 사이토카인 생성과 비장세포 증식능을 측정하였다. 그 결과, 네오아가로올리고당(NAOs) 투여 군에서 2,500 mg/kg BW 농도에서 비장세포 증식능이 증가되었으며, 대식세포에 의한 IL-1 β , IL-6, TNF- α 사이토카인 생성에서도 500 mg/kg BW, 2,500 mg/kg BW 농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 과량의 염증성 사이토카인은 정상세포를 공격하고 염증을 유도하여 세포독성을 일으키는 염증 질환의 매개인자로 알려져 있으나 면역세포에서 분비되는 적절한 양의 염증성 사이토카인은 면역세포를 활성화시켜 암세포에 대한 독성 및 외부 병원체로부터의 저항성을 증가시킨다고 알려져 있다(Hibbs 등 1988; Chiou 등 2001). 따라서 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 와 같은 사이토카인의 생성을 조절하는 것은 대식세포의 활성화를 통한 면역조절에 매우 중요하다고 보고되어 있다. 본 연구에서 네오아가로올리고당(NAOs)의 500 mg/kg BW, 2,500 mg/kg BW 농도로 투여된 마우스에서 비장세포의 증식과 대식세포의 활성을 유도함으로써 면역 활성을 증가시킬 수 있는 가능성을 확인한 중요한 결과라 생각된다. 기존의 연구에서 면역 활성 기능을 가진 한천 유래 여러 천연 다당류가 현재까지 알려져 있으며, 주요 binding

site는 TLR4(Toll-like receptor 4)를 통한 mitogen-activated protein kinases(MAPK) 및 NF-kappa B(NF-kappa B) 신호전달을 활성화하여 수지상세포(DC, dendritic cells)를 활성화시킨다고 알려져 있다(Lee 등 2017). 향후 추가 연구로서, 본 연구의 제한점이기도 한 암컷에서만 진행한 면역 기능성 평가를 암수 동등 비율의 실험동물을 사용하여 확인하고자 하며, 네오아가로올리고당(NAOs)의 면역 증강 효능이 TLR4(Toll-like receptor 4)를 통한 면역학적 기전임을 확인함으로써 향후 네오아가로올리고당(NAOs)이 건강기능식품, 의약품, 화장품 등으로의 기능성 식품 개발과 면역활성 효과의 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2019년도 해양수산부 해양바이오 전략소재 개발 및 상용화 지원-기술상용화지원 사업(20190090)에 의해 수행된 것이며 지원에 감사드립니다.

References

- Byun MW, Byun EH. 2015. Immunological synergistic effects of combined treatment with herbal preparation (HemoHIM) and red ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44:182-190
- Byun EH. 2017. Immunomodulatory activities of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Korean J Food Sci Technol* 49:559-566
- Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. 2001. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 69:625-635
- Chen H, Yan X, Zhu P, Lin J. 2006. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides *in vitro* and *in vivo*. *Nutr J* 5:31
- Chi WJ, Chang YK, Hong SK. 2012. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:917-930
- Groleau D, Yaphe W. 1977. Enzymatic hydrolysis of agar: Purification and characterization of β -neogaretetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can J Microbiol* 23:672-679
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157:87-94
- Hong SJ, Lee JH, Kim EJ, Yang HJ, Chang YK, Park JS, Hong SK. 2017a. *In vitro* and *in vivo* investigation for biological activities of neogaroooligosaccharides prepared by hydrolyzing agar with β -agarase. *Biotechnol Bioprocess Eng* 22:489-496
- Hong SJ, Lee JH, Kim EJ, Yang HJ, Park JS, Hong SK. 2017b. Toxicological evaluation of neogaroooligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agar. *Regul Toxicol Pharmacol* 90:9-21
- Jung JI, Kim JM, Kim HS, Kim HS, Kim EJ. 2019. Immunostimulatory effect of wild-cultivated ginseng extract via the increase in phagocytosis and cytokine secretions in Raw264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48:686-691
- Kang BK, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Park JH, Bae NY, Ahn DH. 2014. Immuno-stimulating activities of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice concentrates on mouse macrophages and spleen cells. *Korean J Fish Aquat Sci* 47:776-784
- Kim HW, Kim KY, Lee SY, Kim GY, Jeon BG, Cho SI, Jeong HW. 2008. Immuno-stimulating effects of Oga-Power (OP) containing extract of *Acanthopanax sessiliflorus* on immune cells in mice. *Korean J Herbol* 23:141-147
- Kim P, Ko SK, Pyo MY. 2010. Effects of hot water extract of chaga mushroom on the proliferation and cytokines production of mouse splenocytes *in vitro*. *Yakhak Hoeji* 54:187-191
- Kim YE, Lee JH, Sung NY, Ahn DH, Byun EH. 2017. A comparative study of the immuno-modulatory activities of ethanol extracts and crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. *Korean J Food Sci Technol* 49:453-458
- Kim MH. 2018. Comparison of chronic disease risk by egg consumption in Korean adult women - Based on the 2013 Korea national health and nutrition examination survey. *Korean J Food Nutr* 31:33-42
- Ko S, Pyo M. 2011. Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus* extracts in Lipopolysaccharide-induced mouse peritoneal macrophage. *Korean J Pharmacogn* 42:253-259
- Kobayashi R, Takisada M, Suzuki T, Kirimura K, Usami S. 1997. Neogaroobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:162-163
- Lee MH, Jang JH, Yoon GY, Lee SJ, Lee MG, Kang TH, Han HD, Kim HS, Choi WS, Park WS, Park YM, Jung ID. 2017. Neogaroohexaose-mediated activation of dendritic cells via Toll-like receptor 4 leads to stimulation of natural killer cells and enhancement of antitumor immunity. *BMB Rep* 50:263-268
- Mischell BB, Shiigi SM. 1980. Normal peritoneal cells. In

- Mischell BB, Shiigi SM (Eds.), Selected Methods in Cellular Immunology. p. 156. W. H. Freeman
- Moon EY, Park SY, Park EK. 1991. Influence of *Angelicae gigantis* radix on the immune system (II): Stimulation of hemolytic plaque forming cells by *in vivo* treatment. *Korean J Immunol* 13:71-77
- Nathan CF, Hibbs JB Jr. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65-70
- Ohta Y, Hatada Y, Nogi Y, Li Z, Ito S, Horikoshi K. 2004. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 β -agarase from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:266-275
- Park J, Hong SK, Chang YK. 2014. Production of DagA, a β -agarase, by *Streptomyces lividans* in glucose medium or mixed-sugar medium simulating microalgae hydrolysate. *J Microbiol Biotechnol* 24:1622-1628
- Ryu HS, Kim J, Kim HS. 2006. Enhancing effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (Sorghum, su-su) extracts on mouse spleen and macrophage cell activation. *Korean J Food Nutr* 19:176-182
- Ryu HS. 2011. Effects of a corn extract on mouse splenocyte and cytokine production by peritoneal macrophages. *Korean J Food Nutr* 24:65-70
- Ryu HS. 2014. Effects of water extract from *Platycodon grandiflorum* on mouse immune cell activation *ex vivo* by oral administration. *Korean J Food Nutr* 27:99-104
- Suh JS. 1996. Effect of *Codonopsis lanceolata* radix water extract on immunocytes. *Korean J Food Nutr* 9:379-384
- Temuujin U, Chi WJ, Lee SY, Chang YK, Hong SK. 2011. Overexpression and biochemical characterization of DagA from *Streptomyces coelicolor* A₃(2): An endo-type β -agarase producing neoagarotetraose and neoagarohexaose. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:749-759
- Wan C, Gao L, Hou L, Yang X, He P, Yang Y, Tang W, Yue J, Li J, Zuo J. 2013. Astragaloside II triggers T cell activation through regulation of CD45 protein tyrosine phosphatase activity. *Acta Pharmacol Sin* 34:522-530
- Yang JH, Cho SS, Kim KM, Kim JY, Kim EJ, Park EY, Lee JH, Ki SH. 2017. Neoagarooligosaccharides enhance the level and efficiency of LDL receptor and improve cholesterol homeostasis. *J Funct Foods* 38:529-539

Received 22 November, 2021
Revised 25 January, 2022
Accepted 08 February, 2022