



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교 육 학 석 사 학 위 논 문

김 추출물에 의한 RAW264.7
대식세포의 항염증 효과

2015년 2월 27일

부경대학교 교육대학원

영양교육전공

이 지 영

교 육 학 석 사 학 위 논 문

김 추출물에 의한 RAW264.7
대식세포의 항염증 효과

지도교수 남택정

이 논문을 교육학 석사 학위논문으로 제출함.

2015년 2월 27일

부 경 대 학 교 교 육 대 학 원

영양교육전공

이 지 영

이지영의 교육학석사 학위논문을 인준함.

2015년 2월 27일

주 심 약학박사 최 재 수 (인)

위 원 이학박사 류 은 순 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

목 차

LIST OF FIGURES	iii
ABBREVIATIONS	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
1) 시약 및 재료	4
2. 실험방법	5
1) 시료의 조제	5
2) 세포의 배양	6
3) MTS assay	6
4) Cytokines 발현 측정	6
5) Western blot analysis	7
① Total cell lysate 추출	7
② 단백질 발현 및 분석	8
6) NO assay	8
7) ROS assay	9
8) 항산화 효소 SOD 활성 측정	9
9) 항산화 효소 Catalase 활성 측정	10
10) 통계학적 처리	10
III. 결과 및 고찰	11
1. 김 추출물(PYE)의 제조	11
2. RAW 264.7 대식세포에 대한 김 추출물의 독성 측정	11

3. 김 추출물의 항산화 효과	13
1) RAW 264.7 대식세포의 ROS 생성에 미치는 영향	15
2) RAW 264.7 대식세포의 SOD 활성 변화	17
3) RAW 264.7 대식세포의 Catalase의 활성 변화	19
4. 김 추출물의 항산화 작용 기전	21
1) RAW 264.7 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향	22
2) 염증 인자 발현에 미치는 영향	24
3) NF- κ B signaling pathway에 미치는 영향	29
4) MAPK signaling pathway에 미치는 영향	31
IV. 결론 및 요약	33
V. 참고 문헌	35



LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Preparation of *Porphyra yezoensis* extract.
- Fig. 2. Effect of *P.yezoensis* extract on cytotoxicity in RAW 264.7 macrophage.
- Fig. 3. Effect of *P.yezoensis* extract on intracellular ROS levels in LPS stimulated RAW 264.7 macrophage.
- Fig. 4. Effect of *P. yezoensis* extract on SOD activity in LPS stimulated RAW 264.7 cells.
- Fig. 5. Effect of *P. yezoensis* extract on Catalase activity in LPS stimulated RAW 264.7 cells.
- Fig. 6. Effect of *P.yezoensis* extract on NO level in LPS stimulated RAW 264.7 cells.
- Fig. 7. Inhibitory effects of *P. yezoensis* extract on TNF- α , IL-1 β production in LPS stimulated RAW 264.7 cells.
- Fig. 8. Inhibitory effects of *P. yezoensis* extract on TNF- α production in LPS stimulated RAW 264.7 cells.
- Fig. 9. Effect of *P. yezoensis* extract on iNOS and COX-2 protein expression in LPS stimulated RAW 264.7 cells.
- Fig. 10. Effect of *P. yezoensis* extract on NF- κ B signaling pathway in LPS stimulated RAW 264.7 cells.
- Fig. 11. Effect of *P. yezoensis* extract on MAPK and Akt signaling pathway in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

ABBREBIATIONS

BCA : bicinchoninic acid
BSA : bovin serum albumin
COX-2 : Cyclooxygenase-2
DCF-DA: 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
ERK : extracellular - signal- regulated kinase
FBS : fetal bovine serum
IL-1 β : Intereukin - 1 beta
I κ B : Inhibitory protein κ B
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
JNK : c-jun amino-terminal kinase
LPS : Lipopolysaccharide
MAPK : mitogen- activated protein kinase
MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NF- κ B p65 : Nuclear factor- kappa B
NO : Nitric oxide
PBS : phosphate-buffered saline
ROS : Reactive oxygen species
RIPA : radioimmunoprecipitation assay
SDS : sodium dodecyl sulfate
SFM : serum free medium
TBS : tri buffered saline
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

Anti- inflammatory Effects *Porphyra yezoensis* Extract in LPS Stimulated
Raw 264.7 Cells

Ji Young Lee

Graduate School of Education
Pukyong National University

Abstract

Many researchers have studied algae as a source of materials with potential biological activities because many marine algae extracts have strong antioxidant properties.

Seaweed which has nutritionally low calories is rich in protein, carbohydrates, dietary fiber, vitamins, and minerals.

In addition, it is known to be high in unsaturated fatty acids and essential amino acids compared to vegetables. *Porphyra yezoensis* out of seaweed such as green laver, *porphyra yezoensis*, *Undaria pinnatifida*, and hijiki is the oldest and highest in intake frequency in daily life. In Particular, it has not only much vitamin B, omega-3 fatty acids, and taurine lowering blood cholesterol, but much more protein and vitamin A. *Porphyra yezoensis* extract used in this experiment has anti-oxidation effect and reduces the incidence of colon cancer.

Also, it is famous for other anti-cancer, and sleep extension effects, also increasing the weight of the number of cells and immune-related organs.

This study was investigated the anti-inflammatory effects of *Porphyra yezoensis* extract (PYE) on RAW 264.7 macrophages by measuring nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD),

catalase activity, inducible NOS (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). PYE decreased the production of intracellular ROS dose dependently and increased SOD and catalase activity in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. PYE significantly suppressed the production of NO and reduced the expression of iNOS, COX-2 and NF- κ B. In addition PYE treatment significantly inhibited the production of IL-1 β and TNF- α and significantly reduced the phosphorylation of Akt and MAPK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These results show that PYE has potential antioxidant and anti-inflammatory actions.



I. 서론

면역은 박테리아나 바이러스 감염에 대해 방어할 수 여러 기전을 통해 활성화되는 숙주방어 형식이다. 하지만 지속적이고 과도한 면역반응은 오히려 조직의 손상을 촉진하고 여러 만성 염증을 유발하게 된다(Brown et al., 2007). 염증의 시작은 외부 자극에 대한 생체의 정상적인 방어 기작이지만 이것이 지속화 되면 관절염, 당뇨병, 동맥경화, 암, 노화 및 알츠하이머병을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 원인이 된다(De Heredia et al., 2012; Osborn and Olefsky, 2012).

선천성 면역과 후천성 면역에 모두 관여하는 대식세포는 adaptive immunity 작용으로 다른 면역세포나 림프구를 활성화시켜 생체 내에서 염증 및 면역 반응을 조절하는 대표적이 세포로 일차적인 보호기능을 한다(Erwing et al., 2007). 대식세포의 주작용은 활성산소(ROS)와 활성질소(RNS)를 무기로 사용하여 세균, 바이러스, 암세포에 대해 공격하며 T cell 활성화 및 B cell 활성화에도 필수적으로 참여함으로써 면역계에서 총체적이고 핵심적인 역할을 하는 세포이다(Hakim et al., 2004). 대식세포는 염증 촉진성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등과 병원균의 내독소로서 그람 음성세균의 막 구조물로 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 이루어져 있고 여러 염증세포들이 생산하는 cytokine들의 생산을 촉진하는 Lipopolysaccharide(LPS)에 의한 자극으로 활성화된다(Marriot et al., 1998). 활성화된 대식세포는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등 외에도 iNOS, COX-2 같은 효소를 생산하여 NO 및 PGE₂ 같은 다양한 염증 매개체들을 생성한다(Nathan., 1992). 염증성 cytokine 및 iNOS, COX-2의 발현은 NF- κ B에 의해 조절되는데 NF- κ B 또한 산화적 스트레스, LPS, cytokine등의 외부 자극에 반응하여 활성화되어 핵으로 이동하여 면역 및 염증 반응에 관여하는 매개체들의 발현을 조절한다(Choi et al., 2003). NF- κ B는 세포질에서 핵으로의 다양한 신호 전달에 관여하는 redox-sensitive transcription factor로 (Grimm S, Baeuerle PA., 1993) p65, p50, I κ B

subunit의 trimer로 구성되어 있고 산화적 스트레스에 의해 I κ B가 분해되면 p65/p50 heterodimer가 핵 속으로 이동하여 연속적인 DNA 결합을 하는 것으로 알려져 있다(Munor et al., 1991). 이러한 과정에서 I κ B를 분해시키는 I κ B kinase의 활성화는 ERK, JNK, p38 subgroups, Akt등의 kinase에 의하여 조절된다. ERK, JNK, p38 subgroups들은 세포증식, 사멸, 분화뿐만 아니라 산화적 손상 시에도 관여하는 인자들이다. JNK는 세포사멸에 주로 작용하고 산화적 손상시 활성화 된다. ERK는 세포성장, 분화를 조절하며 산화적 손상에 의해 활성화되고, 항상성 유지를 위해 세포사멸 억제 신호로 작용한다고 알려져 있다(Nair et al., 2004).

인체의 산소호흡으로 인하여 많은 oxidative stress를 받고 있다. 이것의 방어기전으로 우리 몸은 SOD, Catalase, Peroxidase등의 항산화 효소를 이용하여 활성산소종인 O₂, H₂O₂ 등을 방어한다. Superoxide radical(O₂⁻)은 catecholamine, reduced ferredoxin, leucoflavin등이 자동산화 하거나(Fridovich, 1975), aldehyde oxidase 및 xanthine oxidase 등의 산화 관련 효소 활성화시 또는 활성화된 polymorphonuclear leukocyte neutrophil(PMN)과 macrophage에 의해 식세포작용을 동반한 respiratory burst 가 일어날 때 미토콘드리아와 엽록체 등의 세포 소기관에서 생성된다(Oyamagui, 1981). Hydrogen peroxide (H₂O₂)의 생성은 주로 peroxisome에 존재하는 무수한 oxidase에 의한 O₂의 환원, SOD의 작용으로 인한 O₂의 제거에 의한 생성, diene fatty acid, triene, tetraene fatty acid의 자동산화, 세포막의 산화 시에 생성된다. 이러한 산화 중간체들은 인체의 모든 세포 구성성분인 nucleic acid, lipid, protein, carbohydrate에 oxygen toxicity를 유발한다(Kim et al., 1995). 활성 산소종과 염증성 cytokine은 oxidative stress와 관련이 있다고 알려져 왔으며, TNF- α 와 같은 내독소의 매개체와 단백분해효소 및 활성 산소종 생성을 통해 염증 반응과 산화적 스트레스를 증가시키게 된다(Cho et al, 2008).

해조류는 영양학적으로 열량이 낮고 단백질, 당질, 식이섬유, 비타민, 무기질 함량이 풍부하고 특히 채소에 비해 불포화지방산과 필수아미노산 함

량이 더 높은 것으로 알려져 있다(Jimenez et al.,1999). 해조류에는 김, 미역, 다시마, 톳, 파래 등이 있는데 일상생활에서 섭취빈도가 가장 높은 김은 인류가 이용한 해조류 중 가장 오래되었으며 단백질과 비타민 A가 특히 많이 함유 되어 있고 비타민 B군, 오메가 3지방산 과 혈중 콜레스테롤을 낮추는 작용을 하는 taurine이 풍부한 식품이다(Nishizawa et al.,1988 ; Park CK et al., 2000). 본 실험에서 사용한 김 추출물은 항산화 효과, 대장암의 발병률을 낮추고 그 밖의 항암효과 및 수면 연장효과를 나타낸 것으로 알려져 있고 (Park et al.,1998 ; Noda et al., 1989) 세포 수 및 면역관련 장기의 무게도 증가한다고 하였다(Cho et al., 1990).

앞선 논문들을 바탕으로 김의 항산화 및 항암 효과에 대한 가능성을 확인할 수 있었고 이를 바탕으로 산화적 손상과 깊게 관련되어 있는 항염증 효과와 그 기전을 구체적으로 살펴봄으로써 김의 활용도를 높일 수 있을 뿐 만 아니라 여러 질환에 활용될 수 있는 가능성을 입증할 수 있을 것이라 생각된다.



II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 재료

본 실험에서 사용한 김은 기장에서 구입한 돌김(*P. yezoensis*)을 이용하였다. RAW264.7 세포는 ATCC (TIB-71™)로부터 구입하였다. 배양에 사용된 Fetal bovine serum (FBS), Penicillin/Streptomycin (P/S), Phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco BRL (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 제품을 사용하였고 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sodium bicarbonate, 항생제, Bovine serum albumin (BSA), Trypsin, Protease inhibitor, Detergent는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다.

Western blot에서 세포의 단백질 농도를 측정하기 위해 BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA)를 사용하였고, Protein standard marker는 Dual color marker(BIO-RAD, USA) 제품이다. 각종 Antibody는 Santa Cruz (CA, USA), Cell signaling (Beverly, MA, USA) 제품을 사용하였다. Detection reagent로 Super signal West Pico Luminol/Enhancer Solution 과 Super signal West Pico Stable Peroxide Solution (Piercem, USA)을 사용하여 Kodac film (Rochester, NY, USA)으로 감광하였다.

이외에도 세포의 생존율 측정에는 MTS/PMS solution(Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit)을 Promega에서 구입하였고, 세포 내 ROS 측정은 2',7'-Dichloro fluorescein diacetate (Sigma, USA)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 조제

본 실험에 사용한 김(*Porphyra yezoensis*)은 2012년 3월에 기장군에서 구입하였고, 수세한 후 염분을 제거하고 동결건조기로 건조한 후 마쇄하여 김 분말을 제조하였다. 3구 플라스크에 증류수 1L를 넣고 김 분말 40g을 취하여 침지시킨 후 실온에서 4시간 교반하여 추출하였고 추출액을 원심분리(3500 rpm, 20 min, 4℃)하여 얻어진 상층액에 95% 에탄올을 첨가한 뒤 당을 침전 시켰다. 침전된 당을 분리하기 위해 여과 과정을 거치고 얻은 여액을 감압여과 하여 동결건조한 뒤 -70℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

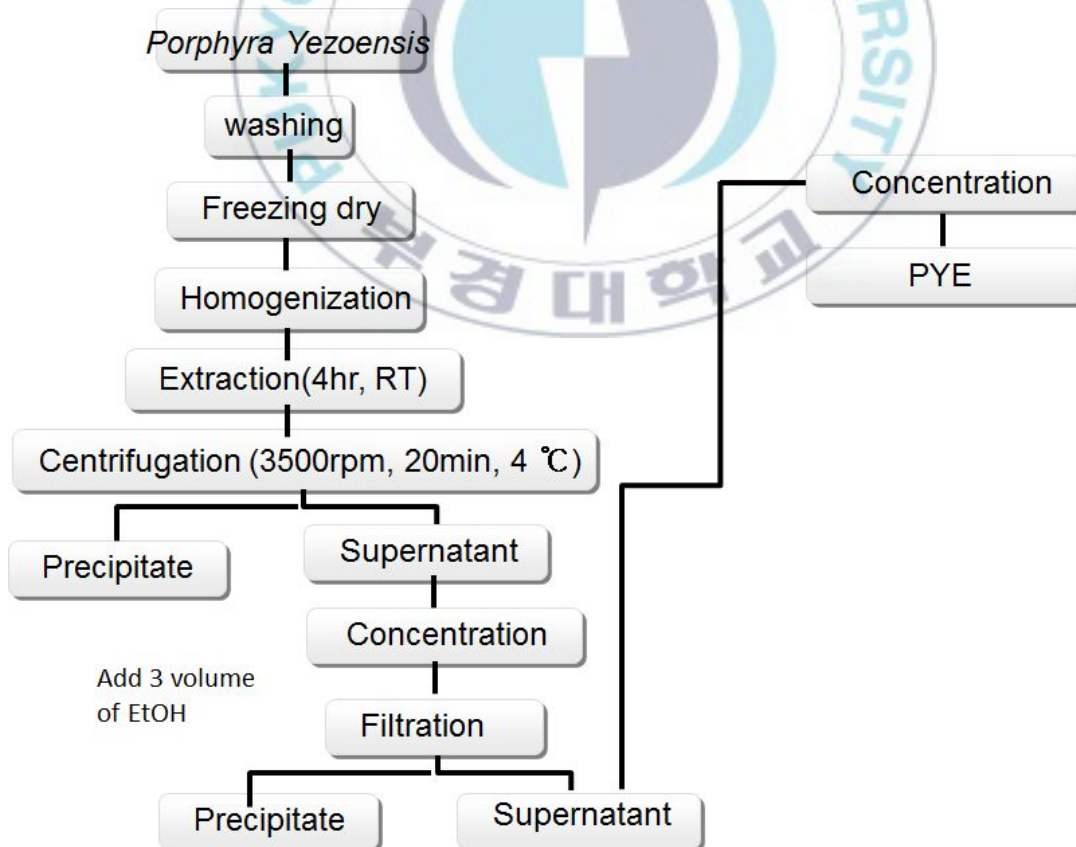


Fig. 1. Preparation of *Porphyra yezoensis* extract

2) 세포배양

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)과 5% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)배지에 37℃, 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 배양하였다. Cell culture plate에 RAW 264.7 세포가 70~80% 정도 자라면 PBS로 씻어낸 후 계대배양하고 배지는 2~3일마다 교체하였다.

3) MTS assay

PYE가 RAW264.7 세포에 세포독성을 유발하는지를 알아보기 위해 MTS assay를 시행하였다. 96-well plate에 10×10^4 cells/well에 세포를 동일하게 분주한 후 세포부착을 위하여 24시간 배양하고, phenol red free-DMEM배지에 12시간을 더 배양한 후 PYE를 0, 5, 10, 20, 40 µg/ml 씩 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphenyl)-2H-tetrazolium, inner salt/phenazine methosulfate. (MTS/PMS) solution (Promega Co., Madison, WI, USA)을 첨가하고 37℃에서 30분 반응시킨 후 ELISA plate reader reader (Benchmark microplate reader; Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)로 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Cytokine 발현 측정

RAW 264.7세포에 LPS 처리를 하게 되면 대식세포는 활성화되어 세포

내 여러 신호전달체계 및 유전자 발현의 변화를 통하여 Cytokine을 만든다. 다양한 종류의 Cytokine 생성에 미치는 PYE의 영향을 조사하기 위하여 TNF- α 와 IL-1 β 의 단백질 양을 측정하였다. RAW 264.7 세포를 100-mm dish에 배양하고 세포가 60~80%정도 증식하면 SFM(Serum Free Media)으로 교체하였다. 6시간 뒤에 PGP(10, 20 μ g/ml)가 처리된 SFM으로 교체하고 4시간 후에 1 μ g/ml LPS를 20시간동안 처리한 후 PBS(Phosphate Buffered Saline)용액으로 세척하고 1ml Lysis buffer(1% Igepal CA-360, 20mM Tris- HCl(pH 8.0), 137mM NaCl, 10% glycerol, 2mM EDTA, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin)로 세포를 취한 다음 12,000xg, 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 취해 Mouse Cytokine Array kit (R&D system Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다. iNOS와 COX-2의 단백질 양은 Western Blot 분석을 통하여 측정하였다.

5) Western blot analysis

① Total cell lysate 추출

김 추출물에 의한 세포내 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 RAW 264.7세포를 100-mm dish에 배양하여 세포가 60~80%정도 증식하면 SFM으로 교체하였다. 6시간 뒤에 PYE (10, 20 μ g/mL)가 처리된 SFM으로 교체하고 4시간 후에 1 μ g/mL LPS를 20시간 동안 처리한 후 PBS용액으로 세척하고 Lysis buffer (50 mM Tris-hydrochloride (Tris-HCl), pH 7.4, 150 mM sodium chloride (NaCl), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM sodium fluoride (NaF), 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate (Na₃VO₄), 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin, 1 mM phenylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.25% Na-deoxycholate)를 RIPA buffer (1% NP-40, 0.25%

Sodium deoxycholate, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 넣어 cell lysate를 회수하고 30분간 방치한 후 원심분리 (12,000rpm, 4°C, 10min) 하였다. 단백질을 측정하기 위해 상층액을 취하여 BCA protein assay kit를 사용하였다.

② 단백질 발현 및 분석

단백질농도를 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 동일하게 정량하여 SDS-PAGE에 전기영동한 다음 PVDF membrane (Millipore Co., Billerica, MA, USA)으로 이동시켰다. 이때 표준 분자량은 dual color marker를 사용하였다. 전기영동 시킨 membrane은 실온에서 1% BSA/TBS-T 로 1시간 30분 동안 blocking 시킨 후 각각의 1차 antibody를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 overnight 시키고 TBS-T로 15분간 2회 세척한 다음 2차 antibody를 1:10,000 비율로 희석하여 1시간 30분간 반응시킨 후 다시 TBS-T로 15분간 2회 세척하고 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/ Enhancer solution (Rockford, IL, USA)을 사용하여 KODAK X-ray film에 감광시켰다. X-ray film을 현상한 후 scanning하여 나온 밴드의 강도를 Science Lab 2005 (Fujifilm, Japan)를 이용하여 비교분석하였다.

6) NO assay

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 5×10^4 cells/well 농도로 96-well plate에 배양한 후에 PYE를 농도별 (0, 5, 10, 20, $40\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 다음 LPS $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액 $100\mu\text{l}$ 와 Griess reagent (1% Sulfanilamide, 0.1% Naphthylethy-diamine-dihydro-chloride in 2.5% phosphoric acid) $100\mu\text{l}$ 를 혼합하여 실온에서 10분동안 반응시킨 후

570nm에서 ELISA plate reader (Benchmark microplate reader; Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)로 흡광도를 측정하고 NO 생성율을 백분율로 표시하였다.

7) ROS assay

세포내 활성 산소(ROS)를 측정하기 위하여 활성산소와 반응하면 형광을 발산하는 DCF-DA (2',7'-dichloro-fluorescein diacetate)(Sigma, St. Louis, MO, USA) assay법으로 측정하였다. RAW264.7 세포를 5×10^4 cells/well 농도로 96-well plate에 배양한 후에 LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 단독 또는 PYE를 농도별 (0, 5, 10, 20, $40 \mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 다음 LPS $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하여 24시간 배양시켰다. 배지를 모두 제거한 후에 PBS에 $20 \mu\text{M}$ 의 DCF-DA를 조제하여 넣고 37°C , 30분간 더 배양하였다. Excitation wavelength 485nm , emission wavelength 530nm 에서 Fluorescence microplate reader로 활성산소를 확인하였다.

8) 항산화 효소 SOD 활성 측정

세포의 SOD측정은 superoxide dismutase assay kit (Cayman chemical, Ann arbor, MI, USA) 를 이용하여 측정하였다. PYE와 LPS를 처리된 RAW264.7 세포를 회수하여 extraction buffer (20 mM HEPES buffer, pH 7.2, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, 70 mM sucrose) $500 \mu\text{l}$ 을 분주한 뒤 homogenizer를 이용하여 균질화 하였다. 그 뒤 원심분리 ($1,500\text{g}$, 5min, 4°C)하여 상층액을 회수하여 사용하였다. 96- well plate에 상층액과 SOD standard solution ($20 \mu\text{l}$ bovine erythrocyte, sample buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0))을 각각 $10 \mu\text{l}$ 씩 분주 한 후에 radical detector ($50 \mu\text{l}$ tetrazolium salt solution, assay buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DPTA), 0.1mM hypoxanthine) $200 \mu\text{l}$ 를 첨가한 뒤 실온에서 5분간 반응시킨 후 xanthine

oxidase (50 μ l xanthine oxidase, sample buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0)) 20 μ l를 넣어 실온에서 20분간 교반한 후에 ELISA plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9) 항산화 효소 Catalase 활성 측정

Catalase의 측정은 catalase assay kit (Cayman chemical, Ann arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다. CAT는 PYE와 LPS가 처리된 RAW264.7 세포를 회수하여 extraction buffer (50 mM potassium phosphate, pH 7.0, 1 mM EDTA) 500 μ l 을 분주한 뒤 homogenizer를 이용하여 균질화 하였다. 그 뒤 원심분리 (1,500g, 5min, 4 $^{\circ}$ C)하여 상층액을 회수하여 사용하였다. 회수한 상층액과 4.25mM formaldehyde standard, positive control, sample을 각각 20 μ l씩 96-well plate에 분주하고 1X assay buffer (100mM Potassium phosphate, pH7.0) 100 μ l, MeOH 30 μ l를 첨가한 후 Hydrogen peroxide (8.82M Hydrogen peroxide) 35 μ l를 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후 potassium hydroxide (10M potassium hydroxide(KOH)) 30 μ l를 넣은 후 Purpald (0.5M hydrochloric acid) 30 μ l를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고 potassium periodate 10 μ l을 첨가하여 ELISA plate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 통계학적 처리

모든 실험의 분석 결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차 (mean $\pm$ S.D.)로 나타내었으며 실험군 간의 유의성은 window용 SPSS 프로그램 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 나타내었다. 반복 측정에 의한 ANOVA Test로 검증한 후, Duncan's multiple range test를 통하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 김(*Porphyra yezoensis*) 추출물의 제조

김 추출물을 제조한 총체적인 과정은 Fig.1에서 보여주고 있다. 따라서 이후 실험에 사용된 시료를 김 추출물, 즉 PYE라 명명하였다.

2. RAW 264.7 대식세포에 대한 김 추출물의 독성 측정

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 생성되는 염증유도 Cytokine 및 NO(Nitric Oxide)생성의 억제 효과가 *Porphyra yezoensis* 로 만들어진 김 추출물에 의한 세포독성으로써 작용할 수 있는지를 검증하고자 세포생존율의 변화를 MTS assay로 분석하였다.

RAW 264.7 세포에 PYE를 5, 10, 20, 40 μ g/ml 의 농도로 처리한 후 24시간동안 배양하였다. 그 결과 20 μ g/ml 이하의 농도에서 99% 이상 생존율을 보여 RAW 264.7 세포의 생존에 영향을 미치지 않고 있음을 확인 할 수 있었다(Fig.2).

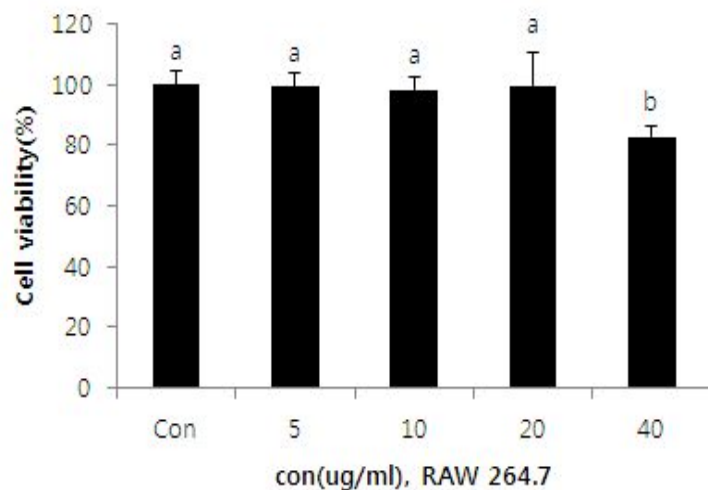


Fig. 2. Effect of *P.yezoensis* extract on cytotoxicity in RAW 264.7 macrophage.

RAW 264.7 cells were incubated with PYE for 24 h at the indicated concentration. The cell viability was determined by MTS assay. Each value is expressed as mean $\pm$ SD in triplicate experiment. Values with different alphabets are significantly different at $P<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. RAW 264.7 cells were

3. 김 추출물의 항산화 효과

산화적 스트레스는 동맥경화, 만성 염증성 질환, 암과 같은 성인병을 야기시키는 1차적 요인일 뿐만 아니라 노화의 주된 요인이기도 하다. 여러 연구에서 활성산소종과 염증성 cytokine은 산화적 스트레스와 관련이 있는 것으로 밝혀졌고 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 병리학적 측면에서 매개체로써 중요한 원인이 되고 있다. 이로 인해 대식세포가 과도하게 자극되면 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-1 β 등과 같은 염증 매개인자와 단백질분해효소 및 활성 산소종 생성을 통해 염증반응과 산화적 스트레스를 증가시키게 된다(Cho et al., 2003).

이러한 산화적 스트레스에 대한 방어기전으로 생체내에는 SOD (Superoxide dismutase), Catalase, Peroxidase 등의 효소들을 가지고 있으며 이 효소들을 이용하여 활성산소종 (ROS, reactive oxygen species)인 O_2^- , H_2O_2 를 제거한다.

활성산소종(ROS)은 산소 호흡시 산소분자(O_2)가 2개의 짝짓지 않은 전자를 함유하고 있어 다른 전자를 받아서 쉽게 물로 환원이 되는데 이 과정에서 짝을 짓지 못한 전자가 남게 되어 radical이 되고 이런 과정에서 반응성이 큰 중간체를 생산하게 되는데 즉, 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)- superoxide radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxy radical($OH^\cdot$)이다. 위에서 언급했듯이 인체는 활성산소종 방어기전으로 O_2^- 제거하는 SOD(Superoxide dismutase)와 H_2O_2 를 제거하는 Catalase를 가지고 있다. SOD와 Catalase는 그 속에 들어있는 금속들이 전자를 주고 받으면서 항산화 기전에 참여하게 되고 SOD는 active site에 redox metal을 가지는 metalloprotein으로 그 종류는 metal cofactor에 따라 Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD로 3가지로 구분된다(Fridovich, 1986).

이러한 항산화 효소들은 열, 스트레스, 염증, nitric acid(NO), TNF등의 외부 산화적 스트레스에 의해 유발되어 활성이 증가되므로 본 연구에서는

PYE가 주요한 염증 매개 인자인 ROS에 어떠한 영향을 주는지, ROS를 제거하는 항산화 효소인 SOD와 Catalase에는 어떠한 영향을 주는지 살펴 보았다.



1) RAW 264.7 대식세포의 ROS 생성에 미치는 영향

ROS는 인체 내 산소의 정상적인 대사작용에 의해서 자연스럽게 생기고 체내로 유입되는 세균이나 바이러스를 제거하는 면역체계에 세포신호와 항상성에 중요한 역할을 한다. 그러나 식품첨가물, 방사선, 알콜, 공해, 자외선이나 높은 열에 노출되는 것처럼 환경적인 스트레스 또는 지속적인 염증 반응에 의해 필요 이상으로 증가하여 질병과 노화의 주된 요인이 되고 있다(Devasagayam et al., 2004). 또한 NF- κ B에 의존하여 염증발현을 조절하여 ROS 저해는 NF- κ B 활성 저해를 유도하여 염증 반응을 억제할수 있다고 보고되고 있다.

따라서 PYE가 RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리하였을 때 생성되는 superoxide radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxy radical(OH^-) 등의 활성산소종 생성에 미치는 영향을 알아보았다.

Fig. 3.를 보면 아무것도 처리 하지 않은 무처리군에 비해 LPS를 처리한 대조군에서 ROS가 유의적으로 증가한 반면 PYE를 농도별 (5, 10, 15, 20, 40 μ g/ml) 처리한 군은 LPS대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 특히 PYE 농도가 높을수록 ROS 농도가 크게 감소되는 것을 볼 수 있다.

따라서 김 추출물이 ROS 에 대해 항산화 효과를 가지고 있는 것을 보여주고 항염증 작용도 할 것으로 생각한다.

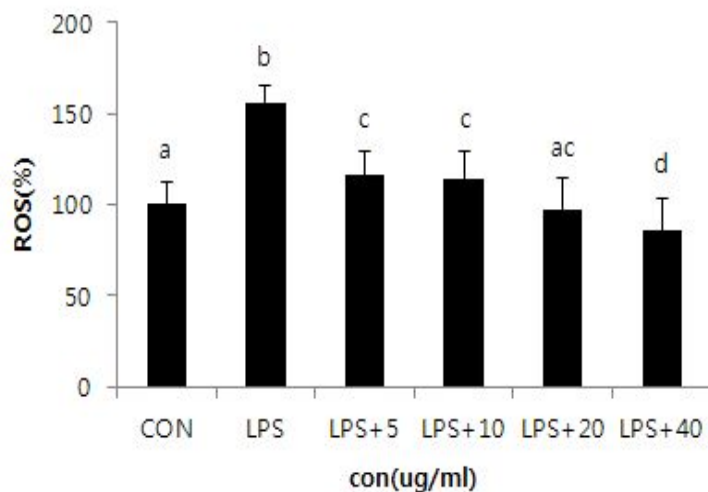


Fig. 3. Effect of *P.yezoensis* extract on intracellular ROS levels in LPS stimulated RAW 264.7 macrophage.

RAW 264.7 cells were incubated with PYE for 24h at the indicated concentration. Each value is expressed as mean $\pm$ SD in triplicate experiment. Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

2) RAW 264.7 대식세포의 SOD 활성 변화

앞 선 RAW 264.7 대식세포의 ROS 생성에 미치는 영향에서 PYE의 농도가 높을수록 ROS생성이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 따라서 ROS 중 O_2^- 제거하는 SOD(Superoxide dismutase)의 농도의 변화를 알아보고 항산화 효과에 영향을 미치는지를 뒷받침하고자 살펴보았다.

Fig4을 보면 LPS 단독 처리 후 대조군보다 SOD활성이 유의적으로 감소 하였고 PYE를 농도별 (10, 20 $\mu g/ml$) 처리한 군은 LPS 대조군보다 유의적으로 SOD 활성이 증가하였다.

ROS 인 O_2^- 는 산소호흡을 하는 호기적 세포에서 생성되며 산화적 스트레스로 인한 과다 생성 시 암, 염증 및 여러 질병의 밀접한 관련이 있다 (Sun et al., 2004). 이렇게 생성된 O_2^- 는 생물체 내에 가지고 있는 SOD에 의해 제거 된다.

앞선 실험과 이 실험에서 대식세포의 LPS 처리는 O_2^- 의 생성을 촉진하는 것으로 나타났고, PYE를 같이 투여하였을 때 SOD 활성이 증가하여 O_2^- 의 생성이 줄어든 것으로 나타났다. 이 결과는 PYE 투여가 LPS처리로 인하여 생긴 내독소의 산화적 스트레스에 대한 항산화 작용이 있는 것으로 사료된다.

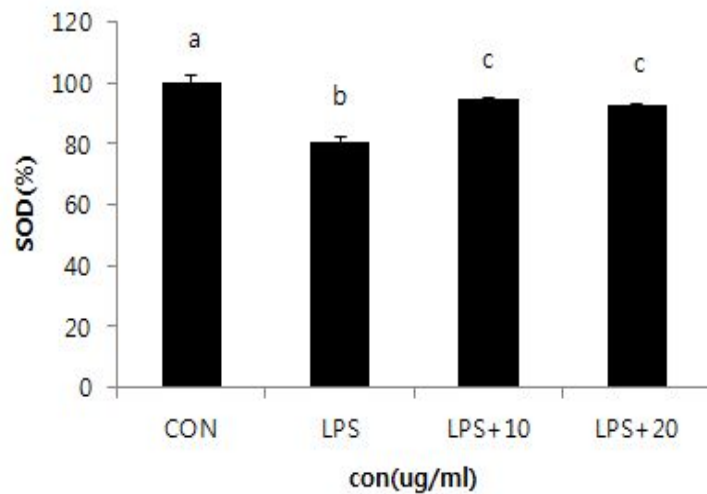


Fig. 4. Effect of *P. yezoensis* extract on SOD activity in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with PYE for 24 h at the indicated concentration. Each value is expressed as mean $\pm$ SD in triplicate experiment. Values with different alphabets are significantly different at $P<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

3) RAW 264.7 대식세포의 Catalase 활성 변화

Catalase는 조직 내의 SOD가 효소 반응에 의해 O_2^- 를 제거 한 후 생성되는 $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ 과 같은 염증성 인자인 cytokine 생산의 2차 messenger 역할을 하는 H_2O_2 를 물로 분해 시켜 생체를 방어하는 항산화 효소이다(Yasui and Baba., 2006).

본 실험에서는 Catalase 활성이 LPS처리 후 PYE를 농도별로 처리 했을 때 SOD활성과 마찬가지로 ROS 생성 감소에 어떠한 영향을 미치는지 살펴 보았다. Fig 5.를 보면 LPS만 처리 했을 때는 Catalase 활성이 유의적으로 감소하였고 PYE 20 $\mu g/ml$ 처리시 유의적으로 증가하였다. 이 결과 PYE가 LPS를 처리한 대식세포에 대해 항산화작용을 하여 Catalase 활성을 증가시켜 ROS 생성을 저해시켰음을 확인 할 수 있었다.

Catalase는 H_2O_2 농도가 다소 높을 때 H_2O_2 를 효과적으로 분해하기는 하지만 H_2O_2 생성속도가 낮을 때에는 H_2O_2 의 분해에 큰 영향을 미치지 못한다. 따라서 산화적 스트레스에 의해 H_2O_2 생성이 증가되면 Catalase의 역할이 필수적이다(Jones et al., 1981).

앞 선 실험들을 종합해 볼 때 LPS처리한 대식세포에 PYE 농도 별로 투여시 농도가 높을수록 ROS 생성 저해 능력이 크고 SOD, Catalase 활성이 높아졌다. 따라서 PYE에는 항산화 능력이 있다는 것을 뒷받침하고 있다.

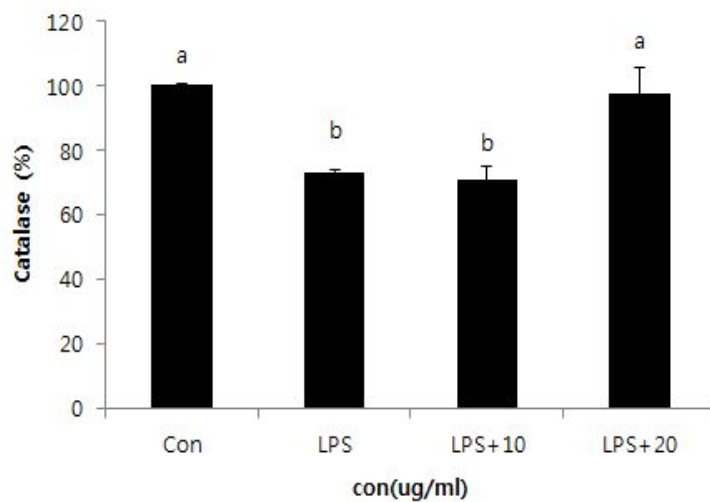


Fig. 5. Effect of *P. yezoensis* extract on Catalase activity in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with PYE for 24 h at the indicated concentration. Each value is expressed as mean $\pm$ SD in triplicate experiment.

Values with different alphabets are significantly different at $P<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

4. 김 추출물의 항염증 작용 기전

염증은 체내에 외부물질 즉, 박테리아나 바이러스 등이 유입되었을 때 면역세포가 이를 인지하여 다양한 염증매개 물질을 분비하여 몸을 방어하는 기전이다(Tizard, 1988). 염증 반응이 과다하게 일어나면 암, 동맥경화 등의 만성질환으로 이어지는 것이다(Coker and Laurent, 1998). 이와 같은 염증반응의 또 다른 원인이 산화적 스트레스에 의한 것이고 흡연, 음주, 스트레스 등이 생체 내 산화적 스트레스를 유발시켜 염증반응을 일으킨다고 알려져 있다(Ryu et al., 2003).

앞에서 PYE는 LPS로 처리한 대식세포에 대하여 항산화 효과를 나타내었다. 세포질 산화 환원 반응은 염증과 관련되어 있기 때문에 항산화 효과는 항염증 효과와 깊게 관련되어 있다고 보고되고 있다(Liang et al., 1999, Lin and Lin, 1997).

염증 반응의 전체적 흐름을 살펴보면 대식세포에서 cytokine, TNF- α , LPS와 같은 자극에 의해 염증 반응의 전사 인자를 활성화시키고 inducible nitric acid (iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)를 발현시켜 nitric oxide (NO)와 prostaglandin(PGE₂)를 생성하여 염증을 일으킨다(Shew et al., 1993; Kwqamata et al., 2000; Lee et al., 2000).

따라서 본 연구에서는 LPS처리에 의하여 유도된 iNOS, COX와 같은 염증 매개 인자와 cytokine의 발현을 살펴봄으로써 PYE에 의한 항염증 효과에 대하여 알아보았다.

1) RAW 264.7 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향

체내염증과정에서 과량의 NO 및 PEG2등의 염증인자는 유도형인 iNOS 및 COX-2에 의해 형성된다. NO를 형성하는 NOS (NO Synthase) 는 L-arginine을 L- citrulline 으로 전환시키면서 NO를 만들어 내며 NOS는 iNOS에 의해 생성되며 이렇게 만들어진 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하고(Schmidt and Walter. 1994) 생체 내에서 빠르게 superoxide와 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite를 형성하여 염증 자극제로서 대식세포를 활성화 시켜(Ippouchi et al., 2002; Kang et al., 2000) NO생성을 현저히 증가시키고 다른 염증 물질들과 함께 과도한 염증을 유발하고 조직의 손상을 일으킨다(Nathan. 1994; Pan et al., 2011).

LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 생성되는 NO에 대한 PYE의 억제효과를 확인하였으며 그 결과는 Fig 6.에서 보는 바와 같다. LPS처리군은 대조군에 비하여 NO생성이 유의적으로 증가하였고 LPS와 PYE를 병행 처리한 군에서는 NO생성이 LPS 처리군에 비해 유의적으로 감소하였다. 각 농도 별로 큰 차이는 보이지 않았으나 PYE농도가 가장 높은 군이 NO생성을 가장 많이 억제 하였다.

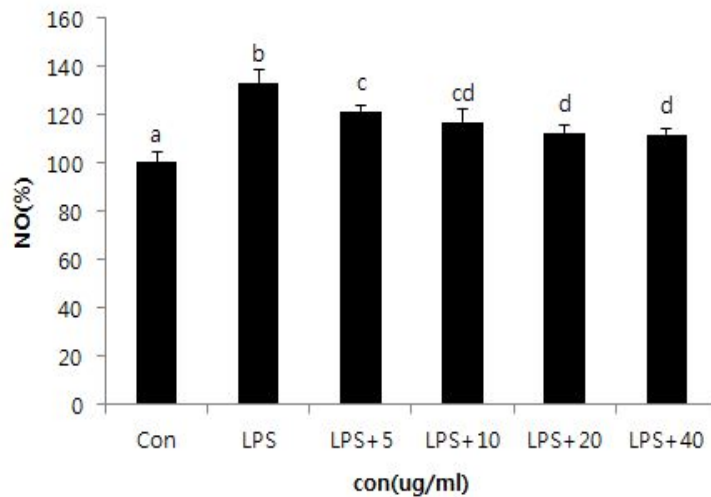


Fig. 6. Effect of *P.yezoensis* extract on NO level in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

The cells were incubated with 100 μ g/ml LPS only or with different concentrations of *P.yezoensis* extract for 24h. The amount of NO were determined by Griess assay. Each value is expressed as mean $\pm$ SD in triplicate experiment. Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

2) 염증 인자 발현에 미치는 영향

활성산소는 염증반응과 깊게 관련되어 있다(Mccord, 1974). 염증은 생리적인 보호기전으로 방어기전을 활성화 시키거나 손상을 제한하지만 활성산소의 파괴적 성향으로 인하여 과다 생성되면 세포와 조직의 손상을 유도하고 더 나아가 만성질환 및 노화를 일으킨다(Azad et al., 2008).

여기서 생성되는 많은 양의 염증 유도 사이토카인(Proinflammatory cytokines)은 대식세포의 phagocytosis 작용을 과도하게 작용시켜 염증반응과 산화적 스트레스를 증가시킨다(Blatteis et al., 2004; Fullerton et al., 2013). 그러므로 염증반응에 대한 생물학적 지표로 알려진 염증 매개인자들과 Cytokines의 단백질 발현을 살펴 볼 필요가 있다. RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리한 후 PYE를 농도별로 처리하고 cytokines(TNF- α , IL-1 β) array를 실시하고, COX-2, iNOS 발현을 Western blot으로 살펴 보았다.

TNF- α 의 경우 LPS 단독 처리군에 비해 PYE를 20 μ g/ml로 처리하였을 때 감소하였고 IL-1 β 도 LPS 단독 처리군에 비해 PYE를 농도별로 처리하였을 때 점차 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig 7.).

LPS에 의해 자극된 대식세포는 TNF- α 를 생성하고 IL-1 β 와 IL-6생성을 유도한다(Beutler and Ceramin., 1989). TNF- α 의 과잉생산은 T cell의 수를 감소시켜 방어체계를 무너뜨리며(Abul et al., 2007) 혈액과 조직사이의 구조물인 내피세포를 자극하여 각종 백혈구들을 염증부위로 이동시키는 역할을 한다. 이를 통해 염증부위로 모인 백혈구는 각종 cytokines를 지속적으로 분비하여 미생물과 암세포에 대한 독성을 유지하거나 염증반응을 유발시켜 조직을 손상시키기도 한다(Tracy et al., 1987). 따라서 TNF- α 분비를 조절하는 것은 염증 반응 조절에 중요한 부분이다. Fig 8에서 LPS처리 후 TNF- α 농도가 대조군보다 급격히 증가하였고 Fig 7과 동일한 결과로 TNF- α 농도가 PYE 농도 20 μ g/ml일 때 유의적으로 낮은 수치를 보여 PYE가 염증반응 조절기능에 관련됨을 보여주고 있다.

IL-1 β 는 대표적인 전 염증성 cytokine으로 TNF- α 의 수용체와 다른 구조를 나타내고 있는데 면역 생물학적 기능으로 볼 때 다른 cytokine보다 TNF- α 와 밀접한 연관이 있다(Zhang et al., 1997). 급성기 염증 반응에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 농도는 급격히 증가하며 상호 상승효과를 나타낸다(Mathiak et al., 2000). Fig 7에서도 대조군에 비하여 LPS처리 후 TNF- α 와 IL-1 β 이 급격히 증가한 것을 알 수 있다.

NOS는 type I, II, III의 3종류로 구분되며 type III인 inducible NOS (iNOS)는 평소에는 세포내에 존재하지 않으나 LPS, cytokine 및 박테리아 독소 같은 자극에 의하거나 NF- κ B활성으로 유도되어 발현하고 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다(Nathan., 1992). 다른 염증인자인 Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환하는 효소이고 COX-1과 COX-2로 나누어지는데 COX-1은 대부분 조직에서 혈소판 활성화, 위장보호, 신장 기능 유지 등의 인체의 항상성 유지기능에 관여하나 COX-2는 cytokine, 자외선, 세균성 내독소 및 TNF등과 같은 여러 종류의 pro inflammatory agent에 의해 과다하게 발현하여 염증 및 각종 퇴행성 질환에 관여하고 (Botting, 2006; Wu et al., 2009) COX-2에 의해 생성되는 PGE₂는 통증, 발열에 관여하는 염증 매개체로서 혈관신생을 촉진시키는 등 암 발생에도 관련이 있다(Masferrer et al., 1994).(홍화) Fig 9에서 보는 바와 같이 NO생성과 관계있는 iNOS의 단백질 발현은 LPS 처리군에 비해 억제되는 것을 확인할 수 있다. 이것은 PYE 처리에 의한 NO 생성의 감소가 iNOS의 발현이 억제되어 지는 것에 의한 것을 알 수 있다. COX-2의 단백질 발현은 iNOS와 마찬가지로 LPS 처리군에 비해 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

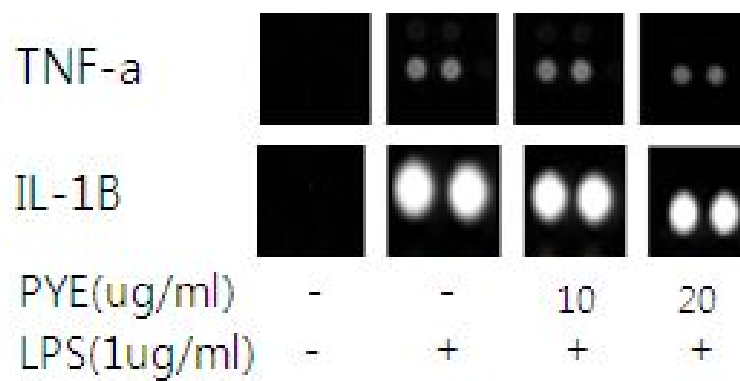
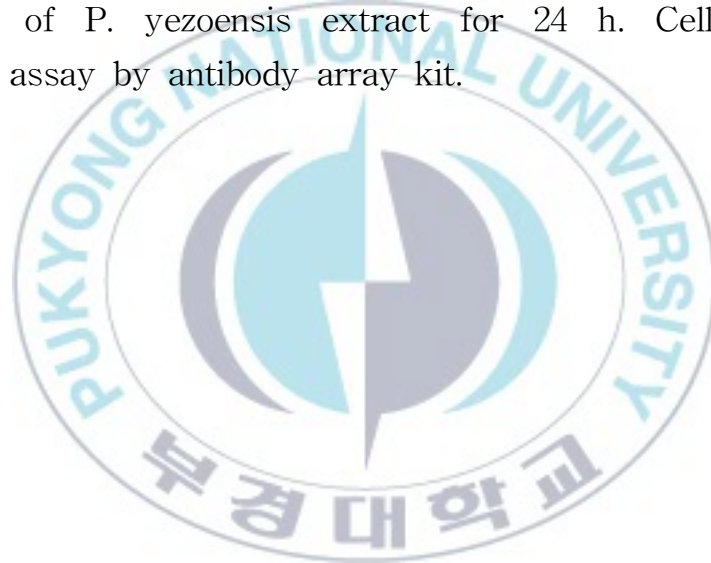


Fig. 7. Inhibitory effects of *P. yezeensis* extract on TNF- α , IL-1 β production in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with LPS only or with different concentration of *P. yezeensis* extract for 24 h. Cell lysate were prepared and assay by antibody array kit.



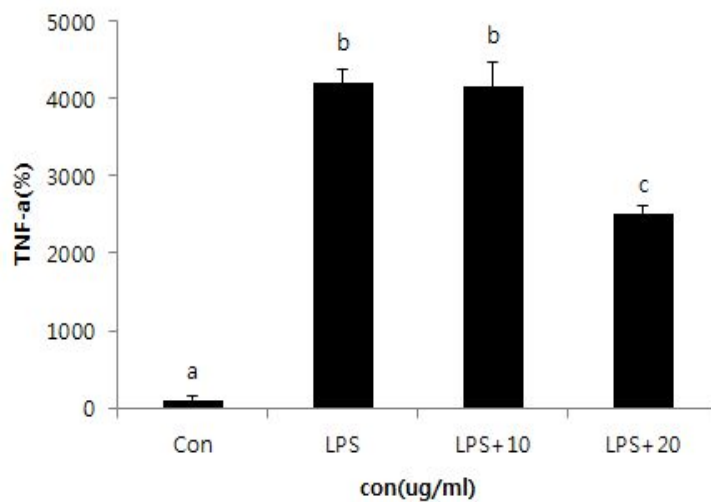


Fig. 8. Inhibitory effects of *P. yezoensis* extract on TNF- α production in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

Each value is expressed as mean $\pm$ SD in triplicate experiment. Values with different alphabets are significantly different at $P < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

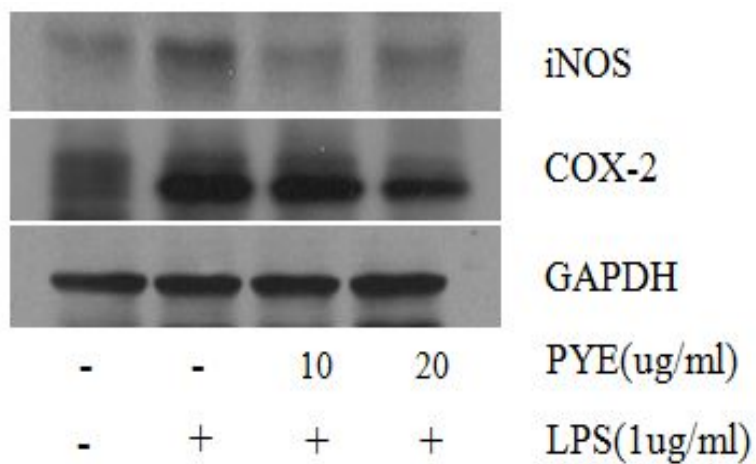
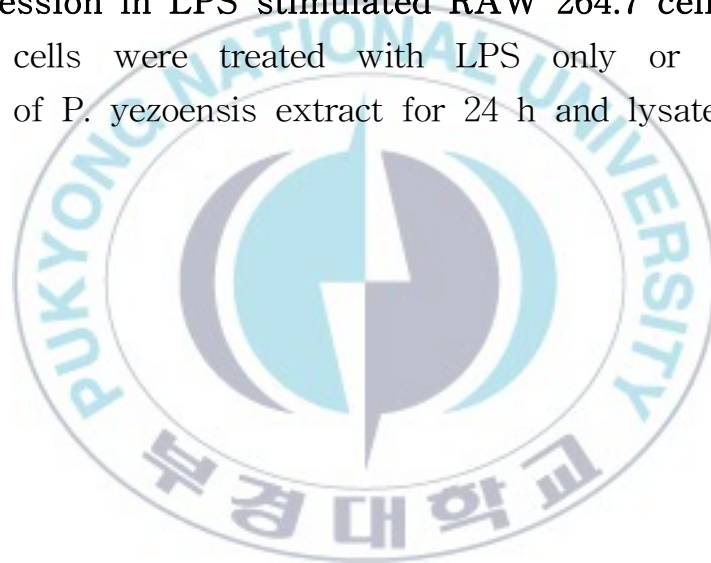


Fig. 9. Effect of *P. yezoensis* extract on iNOS and COX-2 protein expression in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with LPS only or with different concentration of *P. yezoensis* extract for 24 h and lysated for western blot analysis.



3) NF- κ B signaling pathway에 미치는 영향

Nuclear factor kappaB (NF- κ B)는 cytokine, LPS와 산화적 스트레스 등과 같은 여러 외부 자극에 의하여 활성화되어 핵으로 이동하여 면역과 염증반응에 관여한다. NF- κ B는 세포질 속에서 p50과 p65의 heterodimer와 억제 단백질인 I κ B와 함께 복합체를 이루어 불활성형으로 존재한다. LPS, cytokine, ROS 등에 의하여 I κ B kinase가 활성화되고 I κ B가 분해되면 p50과 p65의 heterodimer 형태로 활성화되어 핵으로 이동한다. 핵으로 이동한 NF- κ B는 cytokine, iNOS, COX-2와 같은 염증반응 매개 물질들의 발현을 촉진한다(Lawrence et al., 2001; Riehemann et al., 1999; Allenm and Tresini, 2000).

본 실험에서 PYE는 농도에 따라 cytokine, iNOS, COX-2와 같은 염증반응 매개 물질들의 발현을 감소시켰으므로 이들의 발현을 유도하는 NF- κ B 활성화에 PYE가 어떤 영향을 주는지를 western blot을 통해서 살펴보았다. RAW 264.7세포는 LPS에 의해 자극을 받게 되면 I κ B kinase가 NF- κ B와 I κ B복합체에 작용하여 NF- κ B는 핵으로 이동하게 된다. Fig 10.에서 보는 바와 같이 LPS처리에 의해 NF- κ B와 I κ B는 감소하지만 PYE 농도에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었고 LPS 처리에 의해 증가되는 I κ B 인산화는 PYE 처리로 감소하였다. 이것은 PYE처리로 인하여 I κ B 인산화가 억제되는 것으로 볼 수 있다.

따라서 LPS에 의해서 발생하는 염증발현에 PYE가 NF- κ B signaling pathway에 단계적으로 작용하여 저해효과를 나타내고 있으므로 NF- κ B 활성화 억제를 통해 염증성 매개물을 감소시키면 여러 염증 관련 질환을 예방할 수 있을 것이라 사료된다.

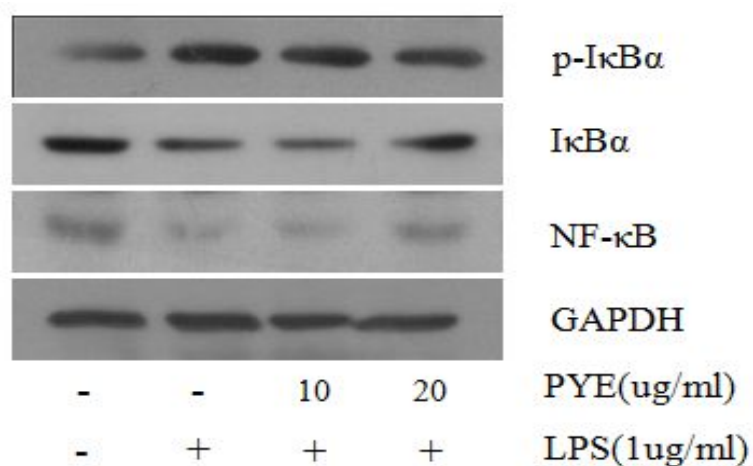
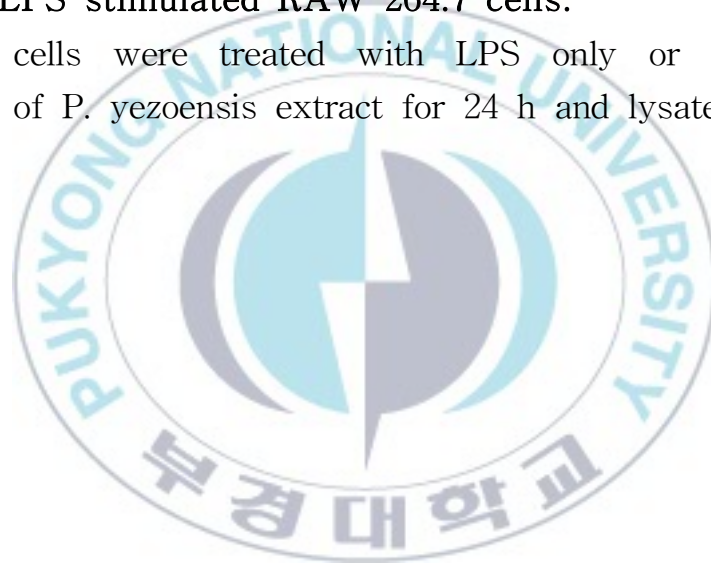


Fig. 10. Effect of *P. yezoensis* extract on NF- κ B signaling pathway in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with LPS only or with different concentration of *P. yezoensis* extract for 24 h and lysated for western blot analysis.



4) MAPK signaling pathway에 미치는 영향

MAPKs는 ERK, JNK, p38 MAPK로 구성되어 있다. MAPKs 신호경로들은 LPS로 유도되어 활성화된다. 활성화된 MAPKs는 NF- κ B 활성화에 관여하여 iNOS 발현 및 전염증성 물질에 발현에 관여한다(Celec, 2004). 그리고 AKT 또한 NF- κ B 활성화뿐만 아니라 대식세포와 혈관세포에서 I κ B활성화에 중요한 역할을 하며 여러 염증 유전자 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다(MacMicking et al., 1997; Sheu et al., 2005).

본 실험에서는 PYE가 NF- κ B pathway를 통해 염증반응을 억제하는 것인지 NF- κ B 활성화의 상위 신호 전달 경로인 MAPKs 및 AKT 인산화에도 영향을 미치는지를 알아보기 위해 MAPKs 및 AKT signaling pathway에 관련된 단백질의 발현 수준을 western blot을 통해서 살펴보았다.

Fig.11.에서 보는바와 같이 AKT, p38, JUK, ERK의 활성화 형태인 p-AKT, p-p38, p-JUK, p-ERK는 LPS 처리시 증가하였으나 PYE 처리에 의하여 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 PYE가 NF- κ B pathway와 MAPKs 및 AKT 경로에도 관여함으로써 NF- κ B 활성화에 대한 PYE의 항염증 효과가 MAPKs 및 AKT의 인산화 과정에 영향을 주는 것으로 보인다.

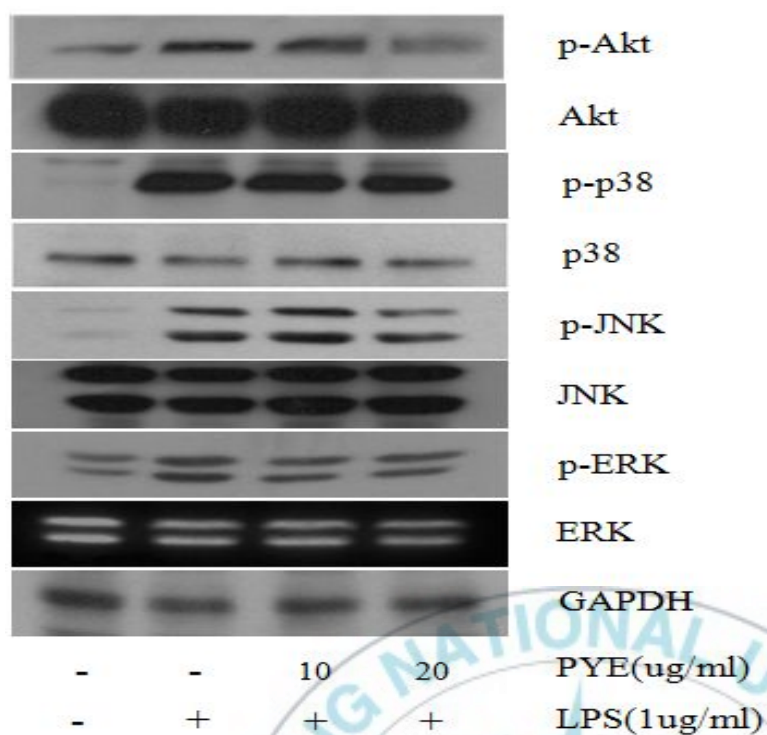


Fig. 11. Effect of *P. yezeensis* extract on MAPK and Akt signaling pathway in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with LPS only or with different concentration of *P. yezeensis* extract for 24 h and lysated for western blot analysis.

IV. 결론 및 요약

최근 천연물 중 항산화 기능을 가지고 있는 생리활성 물질들이 많이 개발되고 있는데 그중 해조류는 셀레늄, 레시틴 등의 무기질 및 비타민이 풍부하고 항산화작용과 항암, 노화방지 등의 효과가 밝혀지면서 해조류를 기능성 소재로 이용하는 연구들이 활발히 진행되고 있다(Chung et al., 1991 ; Li et al., 2003). 항산화효과가 있는 물질은 높은 항염증 작용을 수반하므로 산화적 손상과 관련된 만성 염증성 질환 개선에도 도움이 된다고 보고되고 있다(Liang et al., 1999; Lin and Lin, 1997).

홍조류에 속하는 김은 예로부터 한국을 포함한 중국, 일본 등 아시아 지역에서 섭취하여 왔으며 영양학적 측면으로 열량은 낮지만 비타민, 무기질, 식이섬유가 풍부한 특징을 가지고 있다. 또한 김은 폴리페놀을 함유하여 항산화활성을 가지는 것으로 확인되었으며(Lee and Oh, 2002) 김에 함유된 betaine은 혈중콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있다고 보고되었다(Jung et al., 2001). 특히 건조 김의 10% 내외로 함유되어있는 수용성 다당체인 포피란은 항종양 활성과(Noda and Arashima, 1989) 항산화 활성(Zhang et al., 2004), 지질대사 개선에 대한 효과(Lee et al., 2010) 등이 확인되어 있으나 김의 항염증 효과와 그에 대한 분자기전에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 LPS 자극을 통해 RAW 264.7세포에서 나타난 염증반응에 대하여 김 추출물의 항산화 효과와 항염증효과를 확인하였다. 항산화 활성을 알아보기 위해서 ROS생성과 SOD, Catalase 활성을 확인한 결과 LPS를 처리한 대조군에서 ROS가 유의적으로 증가한 반면 PYE를 농도별 (5, 10, 15, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리한 군은 LPS 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. LPS 단독 처리 후 대조군보다 SOD활성이 유의적으로 감소하였고 PYE를 농도별 (10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리한 군은 LPS 대조군보다 유의적으로 SOD 활성이 증가하였다. LPS만 처리 했을 때는 Catalase 활성이 유의적으로 감소하였고 PYE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시 유의적으로 증가하였다. 이 결과 PYE가 LPS를 처리한 대식세포에 대해 항산화작용을 하여 Catalase 활성을 증가시켜 ROS 생성을 저해시켰음을 확인 할 수 있었다. 산화적 스트레스와 밀접한 염증발현에 대한 김 추출물의 영향력을 알아보

기 위해서 염증반응의 maker인 NO, iNOS, COX-2, Cytokines의 발현을 살펴보았다. 이들은 LPS 처리시 발현이 증가되었고 김 추출물을 농도별로 처리하였을 때 감소하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 김 추출물이 항염증효과를 가지는 것을 확인 할 수 있었고 염증발현에 가장 중요한 역할을 하는 NF- κ B signaling pathway를 살펴본 결과 김 추출물은 LPS 자극에 의하여 I κ B 인산화가 억제되어 NF- κ B가 활성화 되는 것을 억제하였다. 그리고 NF- κ B 활성화의 상위 신호 전달 경로인 MAPKs 및 AKT 인산화에도 영향을 미치는지를 알아보기 위해 MAPKs 및 AKT signaling pathway 에 관련된 단백질의 발현 수준을 western blot을 통해서 살펴보았다. AKT, p38, JUK, ERK의 활성화 형태인 p-AKT, p-p38, p-JUK, p-ERK는 LPS 처리시 증가하였으나 PYE 처리에 의하여 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 PYE가 NF- κ B pathway 와 MAPKs 및 AKT 경로에도 관여함으로써 NF- κ B 활성화에 대한 PYE의 항염증 효과가 MAPKs 및 AKT의 인산화 과정에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

위의 결과들을 종합하여 볼 때, 김 추출물은 LPS로 자극한 RAW264.7 대식세포의 SOD, Catalase활성을 높이는 항산화효과를 나타내며 염증성 cytokines 및 염증 매개 지표인 NO 생성을 억제하고 I κ B의 분해를 저해하여 NF- κ B의 활성을 억제시키며 NF- κ B의 활성화에 관여하는 MAPKs 및 AKT signaling pathway에도 영향을 미치는 것으로 확인 되었다. 따라서 김 추출물은 항염증 효능을 가진 기능성 식품의 소재로서 이용가치가 있음을 제안할 수 있다.

V. 참고 문헌

- Abul K, Abbas, Andrew H and Lichtman. 2005. Immunity to microbes. In: Cellular and molecular immunology. 6th edition. Rebecca G, ed. Elsevier Inc, Philadelphia, USA, 353-354.
- Allenm R and Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. Free Radic Biol Med. 28; 463-499.
- Azad N, Rojanasakul Y and Vallyathan V. 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen / nitrogen species. J Toxical Environ Health B Crit Rev. 11; 11-15.
- Beutler B and Ceramin A. 1989. The biology of cachetin/ TNF- α primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol. 7; 625-655.
- Blatteis CM, Li S, Li Z, Perlik V and Feleder C. 2004. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of complement. Frant Bio Sci. 9; 915-931.
- Botting RM. 2006. Inhibitor of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. J Physiol Pharmacol. 5; 113-124.
- Celec P. 2004. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine the next generation. Biomed Pharmacother. 58; 365-371.
- Chung SR, So MS, Jeune KH. 1992. Studies on bioactive marine natural substance, Lectins; Marine animal lectins(XII). Archives of drug research. 2; 188-199.
- Cho KJ, Lee YS and Ryu BH. 1990. Antitumor effect and immunological activity of seaweeds toward sarcoma 180. J Korean Fish Soc. 23; 345-352.
- Cho SY, Oh YJ, Park JY, Lee MK and Kim MJ. 2003. Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. J Korean Soc Food Sci Nutr. 32; 458-463.
- Coker RK and Laurent GJ. 1998. Pulmonary fibrosis: cytokines in the

- balance. *Eur Respir J.* 11; 1218-1221.
- De Heredia FP, Gomez-Martinez S and Marcos A. 2012. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc.* 71; 332-338.
- Devasagayam TPA, Tilak JC, Bloor KK, Sane Ketaki S, Ghaskadbi Saroj S and Lele RD. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of Association of Physicians of India (JAPI).* 52; 796.
- Fridovich I. 1975. Superoxide Dismutases. *Ann Rev Biochem.* 44; 147-159.
- Fullerton JN, O'Brien AJ and Gilroy DW. 2013. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. *J Pathol.* 231; 8-20.
- Ippouchi K, Itou H, Azuma K and Higashio H. 2002. Effect if naturally occurring organosulfur compounds on nitric oxide production in lipopolysaccharide activated macrophages. *Life Sci.* 71; 411-419.
- Jimenez-Escring A, Goni CI. 1999. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch Latinoam Nutr.* 49; 114-120.
- Jones DP, Eklow L, Thor H and Orrenius S. 1981. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: Relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H_2O_2 . *Arch Biochem Biophys.* 210; 505-516.
- Jung BM, Ahn CB, Kang SJ, Park JH and Chung DH. 2001. Effects of *Hijikia fusiforme* extracts on lipid metabolism and liver antioxidative enzyme activities in triton-induced hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 30; 1184-1189.
- Kang JL, Lee K and Castronova V. 2000. Nitric oxide up regulates DNA bind activity of NF- κ B in macrophages stimulated with silica and inflammatory stimulants. *Mol Cell Biochem.* 215; 1-9.
- Kim JH, Kim YA, Lee EY, Jung YJ, Jun MS and Cho YM. 1995.

- Studies on Superoxide Dismutase(SOD) and Catalase activity under oxidative stress. 梨花藥學研究. 34; 1-8.
- Kwqamata H, Ochiai H, Mantani N and Terasawa K. 2000. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen taiho to in LPS activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 28; 217-226.
- Lawrence T, Gilroy DW and Colville-Nash PR. 2001. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. Nat Med. 7; 1291-1297.
- Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW and Lee HW. 2000. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. Eur J Pharmacol. 406; 301-309.
- Lee JS, Lee MH and Koo JG. 2010. Effect of porphyran and insoluble dietary fiber isolated from laver, *Porphyra yezoensis*, on lipid metabolism in rats fed high fat diet. Korean J Food & Nutr. 4; 562-569.
- Lee NH and Oh KI. 2002. Screening of radical scavenging effects from marine algae. Cheju J life science. 3; 95-101.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin Shiau SY, Chen CF and Lin JK. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis. 20; 1945-1952.
- Lin YL and Lin JK. 1997. (–)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. Mol pharmacol. 52; 465-472.
- Li X, Li Y, Jeong JH, Lee KT, Choi JD, Son BW. 2003. Screening of tyrosinase inhibiting activity from the marine derived fungus. Kor J pharmaco. 34; 138-141.
- MacMicking J, Xie QW and Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. Ann Rev Immunol. 15; 323-330.

- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC and Seibert K. 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91; 3228-3232.
- Mathiak G, Grass G, Herzmann and Luebke T. 2000. Caspase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS-lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. *British J Pharmacol*. 131; 383-386.
- Mccord JM. 1974. Free radicals and inflammation: protection of synorial fluid by superoxide dismutase. *Science*. 185; 529-531.
- Nair VD, Yuen T, Olanow CW and Sealfon SC. 2004. Early single cell bifurcation of pro- and antiapoptotic states during oxidative stress. *J Biol Chem*. 279; 27494-27501.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 6; 3051-3064.
- Nishizawa K and S. Murasugi. 1988. *The Seavegetable Book..* Kensei Press Tokyo. 57-66.
- Noda H, Amono K and Arashima K. 1989. Antitumor activity of polysaccharides and lipids from marine algae. *Nippon suisan gakkaishi*. 55; 1265-1271.
- Osborn O and Olefsky JM. 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*. 18; 363-374.
- Oyanagui Y. 1981. *Superoxide and Medicine*. Kyoritsu Shuppan Tokyo.
- Pan MH, Hong HM, Lin CL, Jhang AZ, Tsai JH, Badmaev V, Nagabhushanam K, Ho CT and Chen WJ. 2011. Se-methylselenocysteine inhibits lipopolysaccharide induced NF- κ B activation and iNOS induction in RAW 264.7 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res*. 55; 723-732.
- Park CK., Kang TH. 2000. The nutritional on functional constituents of laver. *Bull Fish Sic Inst, Yosu Nat'l Univ*. 9; 133-137.
- Park YB, Kim IS, Yoo SJ, Ahn JK, Lee TG, Park DC and Kim SB.

1998. Elucidation of anti tumor initiator and promotor derived from seaweed-2: Investigation of seaweed extracts suppressing mutagenic activity of PhIP and MeJQX. J. Korean Fish Soc. 31; 581-586.
- Riehemann K, Behnke B and Schulze-Osthoff K. 1999. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- κ B. FEBS Lett. 442; 89-94.
- Ryu JH, Ahn H and Kim YK. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS activated macrophage. *Phytother Res.* 17; 485-489.
- Schmidt H and Walter U. 1994. NO at work. *Cell.* 78; 919-925.
- Sheu ML, Chao KF, Sung YJ, Lin WW and Lin-Shiau SH. 2005. Activation of phosphoinositide 3- kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up- regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cell. *Cell signal.* 17; 975-984.
- Shew RL, Papka RE, McNeill DL and Yee JA. 1993. NADPH-diaphorase- positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction. *Peptides* 14; 637-641.
- Sun T, Xie W and Xu P. 2004. Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. *J. carbpol* 58; 379-382.
- Tizard IR. 1988. Immunology; An introduction. 2nd ed. Saunders College Publishing, New York, NY, USA. 423-441.
- Tracy KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT and Kuo GC. 1987. Anti cachectin / TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature.* 330; 662-664.
- Wu DD, Mennerich K, Amdt K, Sugiyama N, Ozaki K, Schwarz J, Wei H, Wu NH and Bishoporic HD. 2009. Comparison of microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion and COX-2 inhibition in acute cardiac ischemia in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 90; 21-25.

- Yasui K and Baba A. 2006. Therapeutic potential of superoxide dismutase for resolution of inflammation. *Inflamm Res.* 55; 359-363.
- Zhang HL, Nagatsu A, Watanabe T, Sakakibara J and Okuyama H. 1997. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem Pharm Bull.* 45; 1910-1914.
- Zhang Q, Ning L, Liu X, Zhao Z and Xu Z. 2004. The structure of a sulfated galactan from porphyra haitanensis and its vivo antioxidant activity. *Carbohydr Res.* 339; 105-111.



감사의 글

우여곡절 끝에 교육대학원을 무사히 마치게 되어 무척 기쁘게 생각합니다. 논문 완성에 많은 지도와 아낌없는 격려를 주신 남택정 교수님께 진심으로 감사드리며 다른 교수님께도 깊은 감사의 말씀 드립니다. 아무것도 모르는 저에게 많은 힘이 되어준 정욱이와 민경이 정말 고맙다는 말을 전하고 싶고 실험실 식구들에게도 고맙다는 인사드립니다.

대학원을 다닐 수 있게 많은 도움을 주신 남식현실장님, 최유리과장님, 행정실 선생님들께 감사드리며 혼자하였다면 할 수 없었을 일을 항상 옆에서 끌어주고 가르쳐준 12학번 동기 언니, 동생들 정말 고맙습니다.

그리고 부모님께 사랑한다고 전하고 싶고 대학원생활에 도움을 준 친구들과 힘들 때 마다 마음의 위로를 준 우주회 친구들에게도 감사드립니다.

이 과정을 바탕으로 사회에 도움이 되는 사람이 되도록 노력하겠습니다. 감사합니다.

