



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

工學碩士 學位論文

참모자반 및 참치심장 에탄올
추출물의 항염증 효과 및
grasshopper ketone의 분리 정제



2015年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

姜 甫 京

工學碩士 學位論文

참모자반 및 참치심장 에탄올
추출물의 항염증 효과 및
grasshopper ketone의 분리 정제

指導教授 安 東 賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함



2015年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

姜 甫 京

姜甫京의 工學碩士學位論文을 認准함

2015年 2月 27日



위원장 수산학박사 조영제 ①

위원 공학박사 전병수 ①

위원 농학박사 안동현 ①

목 차

Abstract	1
서 론	5
재료 및 방법	
1. 실험재료	
1-1. 원료	11
1-2. 동물	11
1-3. 시약	11
2. 추출물 제조	14
3. 방 법	
3-1. 항염증 활성 측정	
3-1-1. 세포배양	14
3-1-2. 세포 독성 측정	14
3-1-3. Nitric Oxides 분비량 측정	15
3-1-4. 염증 관련 cytokines 분비량 측정	16
3-1-5. iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량 측정	17
3-1-6. MAPKs 발현량 측정	18
3-1-7. 귀 부종 측정 및 조직 관찰	19

3-1-8. 단기 독성 평가	20
3-2. 유효 성분 분리 정제	
3-2-1. 계통 분획	20
3-2-2. Silica gel column chromatography	20
3-2-3. Sephadex LH-20 column chromatography	21
3-2-4. High performance liquid chromatography(HPLC)	22
3-3. 정제물의 구조 분석	24
4. 통계처리	24
결과 및 고찰	
1. 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 항염증 효과	
1-1. 세포 독성 측정	24
1-2. Nitric oxides 생성 억제 효과	27
1-3. 염증관련 cytokines 생성 억제 효과	31
1-4. iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현 억제 효과	39
1-5. MAP Kinase (JNK, ERK, p38) 발현 억제 효과	44
1-6. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰	49
1-7. 단기 독성 평가	53
2. 참모자반 에탄올 추출물로부터 grasshopper ketone의 분리 정제 및	

구조 동정

2-1. 참모자반 에탄올 추출물의 계통 분획별 활성	55
2-2. Silica gel column chromatography에 의한 참모자반 n-hexane 추출물의 분획별 활성	59
2-3. Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl_3 : MeOH = 1:1) 에 의한 분획별 활성	60
2-4. Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH) 에 의한 분 획별 활성	62
2-5. HPLC 분석에 의한 정제	64
2-6. Grasshopper ketone의 분자 구조 및 분자량	
2-6-1. NMR spectrum 분석	66
2-6-2. COSY, HMQC spectrum 및 HMBC spectrum 분석	69
2-6-3. Mass spectrum 분석	73
3. Grasshopper ketone의 항염증 활성	
3-1. 세포 독성 측정	75
3-2. Nitric oxides 생성 억제 효과	77
3-3. 염증 관련 cytokines 생성 억제 효과	79
3-4. iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현 억제 효과	84
3-5. MAP Kinase (JNK, ERK, p38) 발현 억제 효과	86
요 약	89
참 고 문 헌	95

Anti-inflammatory Activity of *Sargassum fulvellum*
and Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Heart
Ethanol Extract and
Purification of Grasshopper ketone

Kang Bo-Kyeong

Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Inflammation is the normal immune response to injury caused by both internal and external substances as either self or non-self antigens. And that leads to the activation of several effector cells, such as thymus lymphocytes, neutrophils, and macrophages, and the release of a variety of inflammatory mediators and finalized with the restoration of the tissue structure and function in normal condition. Macrophages and monocytes play an important role in host immune reaction, inflammation and allergic responses. It induces inflammatory reaction and initiate, and maintain specific immune responses by

releasing many kinds of mediators including several types of cytokines. Among various causes of inflammation, macrophage activated by lipopolysaccharide (LPS), derived from cell walls of gram-negative bacteria. Upon stimulating by LPS, two major intracellular signaling pathways are activated in the macrophages: the myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-dependent and independent pathway. The activation of the MyD88-dependent pathway results in the activation of two distinct downstream signaling pathways: the transcription factor nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) pathway and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. These two pathways induce the expression and release of a board array of inflammatory mediators including nitric oxide (NO), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostagladins, interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF)- α and orchestrate the inflammatory responses of the host. However, their overproduction by activated macrophages has been implicated in the pathophysiology of many inflammation diseases, such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis, and cancer. Therefore, LPS-stimulated macrophages are used as a model to study inflammation and the mechanisms of action of potential anti-inflammatory mediators. It is well known that existing

non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were used to treat inflammatory diseases, but NSAIDs could usually cause undesired and serious side effects, especially gastrointestinal injury. Therefore, a strong interest in developing new and more powerful drugs from various natural products has been growing. Then, the anti-inflammatory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (SFEE) and tuna heart ethanol extract (THEE) were investigated using LPS-induced inflammatory response in this study. The murine macrophage cell line RAW 264.7 cells were used. MTT assay was performed to measure the cell proliferation ability. The NO, TNF- α , IL-6, and IL-1 β secretion were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of iNOS, COX-2, NF- κ B protein were studied by immunoblotting. The Balb/c mice were used for an *in vivo* acute toxicity test, and ICR mice were used for evaluation of inhibition rates of croton oil-induced mouse ear oedema. In addition, purification of grasshopper ketone was carried out by liquid and liquid extraction, silica gel column chromatography, sephadex LH-20 column chromatography, and HPLC. As a results, there were no cytotoxicity in the macrophage proliferation treated with SFEE and THEE compared to the control. NO levels decreased with increasing concentration of SFEE and THEE. Moreover, the secretion of

IL-6, TNF- α , and IL-1 β were suppressed dose-dependent manner and were inhibited up to 70% at 100 μ g/mL. Furthermore, iNOS, COX-2, NF- κ B, MAPKs (JNK, ERK, p38) expressions were decreased by treatments of SFEE and THEE. The rate of oedema formation in the mouse ear was reduced compared to that in the control. Moreover, no mortalities occurred in mice administered 5,000 mg/kg body weight of SFEE and THEE over 2 weeks observation period. To separate the active compound of SFEE, the SFEE was partitioned successively with *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water. Among the solvent fractions, the hexane fraction exhibited the highest activities and then the hexane fraction eluted with CHCl₃/MeOH (20:1) mixture by a silica gel column chromatography exhibited the highest activity and this fraction was subjected to sephadex LH-20 column chromatography twice. The highest active fraction was conducted HPLC analysis and the grasshopper ketone was isolated. This compound showed high anti-inflammatory effects of 100%, 97%, and 77% on IL-6, TNF- α , and IL-1 β production at 100 μ g/mL. Also, grasshopper ketone inhibited the LPS-induced phosphorylation of NF- κ B and MAPKs. These results suggest that SFEE, THEE, and grasshopper ketone may contribute to the inhibitory effect on inflammation.

서론

최근 경제 발전에 따른 의료기술의 발달 및 평균수명의 연장으로 고령자 비율이 계속하여 증가하고 있으며, 식생활 및 환경변화로 인해서 전 세계적으로 암, 당뇨병, 고혈압, 비만 및 혈관성 질환 등과 같은 생활습관병의 발병률이 매년 증가하고 있다. 이와 더불어, 환경오염 및 스트레스의 증가에 따른 면역계 이상으로 염증 반응의 만성화가 진행되어 아토피, 천식 등의 만성 염증성 질환이 증가하고 있다(Chang et al., 1994; Heinzemann & Daser, 2002; Song et al., 1998; Sung et al., 2012).

염증반응은 염증 인자의 내인적 발생 또는 외인적 병원체의 침입을 인지하여 제거하고, 손상 부위를 정상 상태로 복구시키는 신체 방어기전으로, 적절한 염증반응은 인체를 보호하는 필수적 반응이나, 과도하고 부적절하게 발생된 염증 반응은 만성으로 진행되어 정상조직의 파괴와 점막 손상의 촉진, 통증, 부종, 발열, 발적 및 기능장애의 증상을 초래하며, 암 또는 관절염 등의 만성질환의 발생과 밀접한 관련이 있다(Kim et al., 2013b; Ljung et al., 2006).

이러한 염증반응에서 주요한 역할을 하는 대식세포는 다양한 숙주반응에 대한 항상성 유지에 관여하며, 염증반응에서 여러 자극 또는 면역세포들이 분비하는 cytokine에 의해 활성화되어 염증부위로 타 면역세포의 이동을 촉진시킴으로써 염증반응을 더욱 심화시킨다(Higuchi et al., 1990). Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 cell은 그람음성균의 세포외막에 존재하는 내독소인 lipopolysaccharide(LPS)의 자극에 의해 nitric oxide(NO), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α),

IL-1 β 과 같은 염증 매개물질의 분비를 촉진한다. 이러한 물질들은 cyclooxygenase(COX)의 작용을 통해 leukotriene, prostaglandin 등의 생성을 유도하거나, NO의 대량생산을 유도함으로써 숙주에 치명적인 결과를 초래하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2009; McDaniel et al., 1996). 특히 COX는 세포막의 인지질로부터 유리된 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시키는 효소로 COX-1, COX-2의 iso-form이 존재하는데(Smith et al., 2000), COX-1은 정상조직에서 상시 발현되어 점막보호, 혈소판 형성 등의 인체 항상성 유지의 역할을 하는 반면, COX-2의 경우 염증 반응 시에만 LPS나 cytokine, growth factor 등의 자극에 의해 활성화된 대식세포와 단핵구로부터 생성되어 prostaglandin을 생성한다. 이렇게 발생된 prostaglandin은 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다(Bishop-Bailey et al., 2002; Seibert et al., 1994). 또한 염증반응에서 과잉으로 생산되는 것으로 알려진 NO는 세포 내에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 생성되는 것으로, 신경계, 면역계, 심혈관계에서 주요 신경전달물질의 역할을 한다. 이러한 NOS는 포유류에 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)의 3종류가 있으며, 그 중 iNOS는 외부자극이나 pro-inflammatory cytokine의 신호전달에 의해 단핵구, 대식세포, 골수세포 등에서 발생하여 다량의 NO를 생성하는 효소이다(Lee et al., 2007). 대식세포의 염증반응에서 이러한 염증성 cytokines, COX-2 및 iNOS와 같은 염증 매개체들의 발현은 주요 전사인자인 nuclear transcription factor kappa-B(NF- κ B)와 activator

protein-1(AP-1)의 활성화에 의해 조절되며(Baeuerle & Henkel, 1994;), 그 중 NF- κ B은 p65 및 p50의 두 개의 subunit을 가지는 단백질로, 정상상태에서는 inhibitor kappa-B (I κ B)와 결합하여 불활성 상태로 세포질에 격리되어 있으나(D'Acquisto et al., 1997; Makarov 2001), 염증반응 시에는 활성화된 I κ B kinase의 작용에 의해 I κ B가 인산화되면서 NF- κ B가 유리되어 활성화된다(Majdalawieh & Ro, 2010). 이렇게 활성화된 NF- κ B는 세포의 핵 내부로 들어가 염증 매개 유전자의 promoter에 결합하여 NF- κ B 의존전사를 유도하게되며, 이는 TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS 및 COX-2등의 여러 염증 매개물질의 생산을 촉진하여 염증을 심화한다(Straus et al, 2000). 이러한 NF- κ B 의존전사 경로 이외에도, 대식세포에서 LPS 자극에 의해 활성화되는 다른 대표적 신호는 mitogen activated protein kinases(MAPKs)으로, 포유류에서는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase(JNK), p38 protein kinase(p38)의 3종이 알려져 있다(Kim et al., 2013b). 이러한 MAPKs의 활성화는 인산화에 의해 조절되며, MAPKs가 인산화되어 활성화되면 AP-1이 활성화됨에 따라 iNOS 및 interleukin 단백질의 전사가 일어난다. 또한 MAPKs는 I κ B kinase의 활성화를 조절하는 것으로도 알려져있다(Marks-Konczalik et al.,1998; Zhang & Ghosh, 2000). 따라서 대식세포를 매개한 급성 염증반응의 조절을 위하여 iNOS, COX-2, NF- κ B의 발현 및 MAPK의 인산화 조절과 cytokine 분비 조절은 염증반응의 핵심요소로 인식되고 있으며, 이와 같은 인자들의 활성을 조절하는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로서 주목받고 있다(Kim et al., 2013b).

오랜 기간 동안 hydrocortisone, prednisolone, betamethasone과 같은 steroids는 임상적으로 염증을 억제하는 약물로 이용되어 왔으나, 간 손상, 암, 뇌졸중과 같은 여러 심각한 부작용을 초래하여 사용 시 제한성이 있으며, aspirin, indomethacin, phenylbutazone과 같은 nonsteroidal antiinflammatory drugs(NSAIDs) 역시 위장관 출혈, 신장 및 심장 질환 등의 심각한 부작용을 가지고 있어 그 사용이 제한되고 있다(Dogne et al., 2006; Makins & Ballinger, 2003, Rainsford, 2007). 따라서 보다 안전한 염증치료제의 개발이 촉구되고 있는 한편, 천연물로부터 분리, 정제된 물질은 비교적 독성이 적어 의약품에 비해 장기간 섭취가 용이하다는 장점을 가지고 있어 현재 각종 생약추출물 및 식품을 이용한 염증성 질환의 치료제 개발이 활발히 이루어지고 있다(Lee et al., 2011; Kwon et al., 2009).

현재 천연물을 이용한 염증반응 완화에 대한 연구로는 딱지꽃(Kang et al., 2013), 청시닥나무(Lee et al., 2012a), 등골나물(Lee et al., 2012b), 꽃송이버섯(Choi et al., 2013c), 감귤류 과피(Lee et al., 2013), 소태나무 잎(Jung et al., 2013)등의 육상식물에 대한 연구와, 금은화(Yun et al., 2012), 자초(Choi et al., 2013b), 홍화자(Kim et al., 2013a) 등의 생약재에 대한 연구가 주를 이루고 있으나, 이러한 육상식물이나 생약재 원료의 생리활성 기능 연구는 이미 그 한계치에 이르고 있다.

한편, 해양생물은 지구 생물 중 약 80%를 차지하는 것으로 알려져 있으며(Kwak et al., 2005), 육상 생물에 비해 고염, 고압의 특수한 환경에서 생육하면서 다양한 미네랄 성분을 함유하고 있어, 오래전부터 한국, 일본 등에서 활발하게 이용되어 왔다(Kim et al., 2007b). 해조류의

생리활성으로는 고지혈증, 고혈압 예방(Bae, 2004), 항암(Jin & Jin, 2007), 항돌연변이(Choi et al., 2005), 항염증(Kang et al., 2008) 및 항응고(Lim et al., 2008)등의 기능이 보고된 바 있으며, 특히 갈조류 중에서는 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리한 fucoxanthin (Heo et al., 2010)과 감태(*Ecklonia cava*)에서 분리된 phlorotannin (Ryu et al., 2009) 등이 보고되고 있다.

본 연구에서 사용된 모자반(*Sargassum fulvellum*)은 한국, 일본 등 동남아시아 일대에 널리 분포하는 다년생 갈조식물로 우리나라에서는 전 해안에 걸쳐 팽생이모자반, 알송이모자반, 파배기모자반, 짝잎모자반 등을 포함하여 약 20여 종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다(Kang et al., 2012). 특히 식용으로 이용되는 모자반은 ‘참물’ 또는 ‘참모자반’으로 불리어지는데, 주로 cellulose, fucoidan, laminaran, alginic acid 등의 복합 다당류가 36~60%로 풍부하게 함유되어 있으며, 이외에도 단백질 약 15.8%, 지질 5% 및 회분 27.5%을 함유하고 있는 것으로 보고되어 있다(Kang et al., 2008; Lee et al., 1996). 이러한 모자반은 동의보감에 따르면 예로부터 흑, 부종, 음낭수종 및 배뇨장애 등에 널리 이용되어 온 것으로(Donguibogam Committee, 1999), 생리활성에 대한 연구로는 항암(Bae, 2004), 항균 및 항산화 효과(Lee et al., 2000a; Lee et al., 1996; Haung & Wang, 2004), 항혈액응고능(Gray et al., 1975), 물 추출물의 항염증 활성(Jeong et al., 2012)에 대한 연구가 진행된 바 있으나, 현재까지 참모자반의 항염증 효과 물질에 대한 분리, 정제 및 분석에 대한 연구는 진행 된 바 없다.

한편, 참치(*Katsuwonus pelamis*)는 농어목 고등어과의 바닷물고기로,

연간 어획량은 2000년 이후 큰 변동 없이 약 23만~27만 M/T 범위로 다량 어획 되고 있다(Kang et al., 2000; Oh et al., 2007). 어획된 참치는 주로 통조림 제조에 이용되는데 참치 통조림 가공 시 가식부 55%를 제외하고 약 45% 정도의 부산물이 생성되어, 통조림 제조량의 증가에 따라 가공공장에서 나오는 폐기물 양이 증가하여 환경문제가 발생하고 있으며, 따라서 효율적인 회수와 이용이 매우 절실한 실정이다. 참치 가공 시 발생하는 부산물에는 껍질, 자숙액, 뼈, 심장 및 내장이 있는데, 그 중 껍질은 주로 젤라틴 추출(Cho et al 2005, Rahman et al, 2008), 자숙액은 항산화(Lee et al 2008, Jang et al, 2009), 항암(Jang et al, 2009)효과, 뼈는 임플란트용 생체 소재 개발(Seo et al 2008), 내장은 내장유의 레시틴 분리 정제(Kim et al., 1998) 등의 분야에서 그 효율적 이용을 위해 활발히 연구되고 있으나, 심장의 경우 단독으로 그 기능성이나 이용에 대해 연구된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 이러한 참모자반 및 참치 심장 에탄올 추출물의 항염증 효과에 대해 살펴보고, 특히 참모자반 에탄올 추출물로부터 항염증 유효 성분을 분리 정제하여 효과적인 염증 치료제의 소재를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 원료

본 실험에 사용한 참모자반(*Sargassum fulvellum*)은 진도의 양식장에서 구입한 것으로 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후, 이를 분말화하고 진공 포장하여 -20°C 에서 저장하며 사용하였다. 참치(skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*) 심장 분말은 참치의 자숙처리 후 즉시 채취되었으며, 세척 후 동결건조하여 분쇄한 것으로, 동원F&B로부터 공급받아 4°C 에 저장하며 사용하였다. Table 1은 참치 심장의 일반성분 및 염도를 나타낸 것이다.

1-2. 동물

생후 8주령의 수컷, ICR mouse를 오리엔트바이오(Orient Co., Seongnam, Korea)로부터 구입하여 귀 부종 실험에 사용하였으며, 생후 10주령의 암컷, Balb/c mouse는 단기 독성 평가 실험에 사용하였다. 마우스는 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 10\%$, 12시간 명암주기가 유지되는 동물사육실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다.

1-3. 시약

Fetal Bovine Serum(FBS), penicilline/streptomycin은 Hyclone (Logan, USA)에서, TNF- α , IL-6 및 IL-1 β ELISA kit는 BD Science(San Diego, USA)에서 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지는 GIBCO(Grand Island, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO), Lipopolysaccharide(LPS), 3-(4,5-dimethyl thiazol 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) Reagent 는 Sigma사

(St.Louis, USA)에서 구입하였으며, iNOS, COX-2, NF- κ B p65, p-JNK, p-ERK, p-p38 및 β -actin의 항체와 Anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxidase는 Santa Cruz(San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. BCA Protein assay kit 및 Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Thermo scientific(Rockford, IL, USA) 제품을 구입하여 실험에 이용하였다.



Table. 1 General compositions and salinity of tuna heart

General compositions	Tuna heart (%)
Moisture	65.63
Crude protein	29.86
Crude fat	1.06
Carbohydrate	2.3
Crude ash	1.15
Salinity	0.4



2. 추출물 제조

건조분말 상태의 참모자반 및 참치심장에 각각 10배의 95% 및 80% 에탄올을 가한 후 교반기(H-0820, Dongwon science co., Busan, Korea)를 이용하여 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 이를 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하고, 잔사를 이용하여 이와 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였다. 추출하여 모은 상층액은 여과하여 37℃에서 감압농축기(RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan)로 농축한 뒤 건조하였다. 건조된 시료는 -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

3. 실험 방법

3-1. 항염증 활성 측정

3-1-1. 세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM에 10% Inactivated fetal bovine serum과 1% Penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 Passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

3-1-2. 세포 독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등(2006)의 방법을 약간 변형

하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell 1×10^6 cells/mL를 well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 참모자반 및 참치심장 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 첨가하여 2시간 재 배양하고 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 microplate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density (O.D.))를 측정하였다. 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation Index(\%)} = (\text{sample O.D.} / \text{control O.D.}) \times 100$$

3-1-3. Nitric Oxides 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess 반응(Lee et al., 2000b)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell은 DMEM 배지를 이용하여 2.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 참모자반 및 참치심장 추출물을 각각 처리하여 24시간 재 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 동량의 griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond,

USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO_2)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

3-1-4. 염증 관련 cytokines 분비량 측정

염증 관련 cytokine의 분비량을 측정하기 위해 RAW 264.7 cell을 DMEM 배지를 이용하여 2.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% CO_2 incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 18시간 전 배양하였다. 세포에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 참모자반 및 참치심장 추출물을 처리하여 12시간 재 배양하였다. 세포배양액 내의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β cytokine의 분비량을 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 를 분주하여 4 $^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse TNF- α , IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1 β 의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1 β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여

실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후, microplate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3-1-5. iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현량 측정

iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현에 미치는 시료의 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 cell을 DMEM 배지를 이용하여 iNOS, COX-2의 경우 1×10^6 cells/mL, NF-κB의 경우 4×10^6 cells/mL으로 조절하여 20 시간 전 배양 하였다. 세포에 1 µg/mL의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL의 참모자반 및 참치심장 추출물을 처리하여 iNOS, COX-2의 경우 18 시간, NF-κB의 경우 30분 재 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척한 후, Sheeba와 Asha(2009)의 방법에 따라, 세포질 내의 iNOS, COX-2 단백질 측정을 위하여 cytosol lysis buffer(50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Deoxycholate, 5 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 µg/mL Aprotinin, 1% Triton X-100, and 0.1% NP-40)를 첨가하여 30분간 4°C에서 Lysis 시켰으며, NF-κB p65의 경우 핵 내의 NF-κB p65 단백질 측정을 위하여 먼저 hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)를 첨가하여 15 분간 4°C에서 lysis 시켜 crude cytoplasmic fraction을 제거한 후, 남은 pellet에 nuclear extraction buffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol (DTT))을 첨가하여 lysis 시켰다. 그 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성

분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였으며, 30 μ L의 lysate를 Laemmli(1970)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등(1979)의 방법을 참고하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(Bio-rad)에 200 mA에서 1시간 동안 전사시킨 후, 5% Skim milk가 포함된 TBST(tris buffered saline; pH7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. iNOS, COX-2 및 NF- κ B p65의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 ECL 기질과 1~3분 간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool(GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)를 이용하여 가시화 하였다.

3-1-6. MAP Kinase (JNK, ERK, p38) 발현량 측정

MAPKs의 발현에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 cell을 DMEM배지를 이용하여 1×10^6 cells/mL으로 18시간 전배양 하고 참모자반 및 참치심장 추출물을 농도별 (0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL 농도로 처리하여 30분 분 배양 하였으며, 이후의 실험은 3-1-5와 동일한 방법으로 진행하였다. p-JNK, p-ERK, p-p38의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse JNK, ERK 및 p38을 이용하여 1:5000으로

회석하여 사용하였다.

3-1-7. 귀 부종 측정 및 조직 관찰

참모자반 추출물 및 분획물, 참치심장 추출물의 항염증 효과를 *in vivo* 모델을 이용하여 검증하기 위하여 각각 Kim 등(2002a)과, Saraiva 등(2011)의 방법에 의거하여 귀부종 측정 및 조직 관찰을 진행하였다. ICR 마우스에 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg·body weight 농도로 200 μ L씩 경구 투여 하였다. 또한 control 구로 prednisolone을 10, 50 mg/kg·body weight로 시료와 동량 경구 투여 하였다. 한 시간 후, 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 μ L/ear 농도로 도포하였다. 귀 두께는 croton oil을 처리하고 5시간 후에 측정 하였으며 croton oil 처리한 후 두께의 증가를 부종의 형성으로 간주 하였다.

조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 추출물을 100 mg/mL 농도로 20 μ L씩 도포하였으며, control구로 prednisolone을 0.08 mg/ear이 되도록 20 μ L 도포하였다. 15분 뒤, 5% croton oil을 20 μ L씩 도포하였다. 6시간 뒤, diethyl ether로 마취사 시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72 시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin 및 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

3-1-8. 단기 독성 평가

본 실험은 식품의약품안전처 고시 제 2014-136호(2014년 7월 30일 개

정) ‘의약품 등의 독성시험기준’와 Seok 등(2014)의 연구내용을 바탕으로 실험을 수행하였다. Balb/c 마우스를 실험 시작 전에 4~6시간 정도 절식시킨 후에 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 300, 2,000 및 5,000 mg/kg·body weight 농도로 경구 투여 하였다. 6시간 동안 비정상적인 행동 등의 경과를 관찰하였고 2주까지 사망 여부를 지속적으로 관찰하였다.

3-2. 유효 성분 분리 정제

3-2-1. 계통 분획

참모자반 및 참치심장을 이용하여 상기 방법으로 에탄올 추출물을 얻은 후, Fig.1과 같이 극성이 낮은 용매에서 높은 용매로 순차적으로 계통분획을 진행하였다. 에탄올 추출물을 10배량의 증류수에 현탁한 후 동량의 *n*-hexane(C_6H_{14} , Hex)을 가하여 180 rpm에서 2시간 동안 shaker(Dongwon Science Co., Busan, Korea)에서 교반한 후 상층액을 취하여 여과, 감압농축하여 *n*-hexane 분획을 얻었으며, 동일한 방법으로 chloroform($CHCl_3$), ethyl acetate($CH_3COOC_2H_5$, EtAOc), butanol(C_4H_9OH , BuOH) 분획을 얻었다. $CHCl_3$ 분획은 하층액을 취하였으며, EtAOc 및 BuOH 분획은 상층액을 취하였다.

3-2-2. Silica gel column chromatography에 의한 참모자반 *n*-hexane 추출물의 분획

참모자반 에탄올 추출물의 *n*-hexane 분획물을 $CHCl_3$ 에서 methanol(CH_3OH , MeOH)로 용매 계를 단계적으로 변화시켜가며

silica gel column chromatography를 실시하여 분획물을 얻었다. 활성화된 silica gel(70 - 230 mesh; Merck Art, Darmstadt, Germany)에 CHCl_3 을 가하여 slurry로 만들고 glass column(5 × 10 cm column)에 충전한 후 이를 CHCl_3 로 세척하였다. 참모자반 Hex 분획물을 column에 loading하였다. CHCl_3 과 MeOH을 용매계로 하여 50:1, 20:1, 10:1, 5:1 비율로 순차적으로 분획하여 7개의 분획물을 얻었다. 분리된 분획물은 감압농축하여 37℃에서 완전히 건조시킨 후 용매에 희석하여 항염증 활성을 측정하였다.

3-2-3. Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 분획별 활성

Silica gel column chromatography에 의해 얻어진 7개의 분획물 중 활성이 높은 4번 분획을 이용하여 sephadex LH-20 column chromatography를 진행하였다. 사용 용매는 CHCl_3 과 MeOH을 1:1로 혼합하여 사용 또는 MeOH을 이용하였으며, 사용 용매를 이용하여 sephadex LH-20(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)를 slurry로 만들고 glass column (2.5 × 90 cm column)에 충전한 후 4번 분획물을 column에 loading 하였으며, CHCl_3 :MeOH=1:1을 용매계로 하여 6개의 분획을 획득하였다. 그 중 항염증 활성이 가장 높았던 5번 분획을 sephadex LH-20 column chromatography(MeOH)을 이용하여 정제하였다.

3-2-4. HPLC

Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분리된 획분을 회석하여 preparative HPLC(ODS column, 10×150 mm, 25% aqueous MeOH, 3 mL/min)를 실시하여 grasshopper ketone을 분리 정제 하였다.



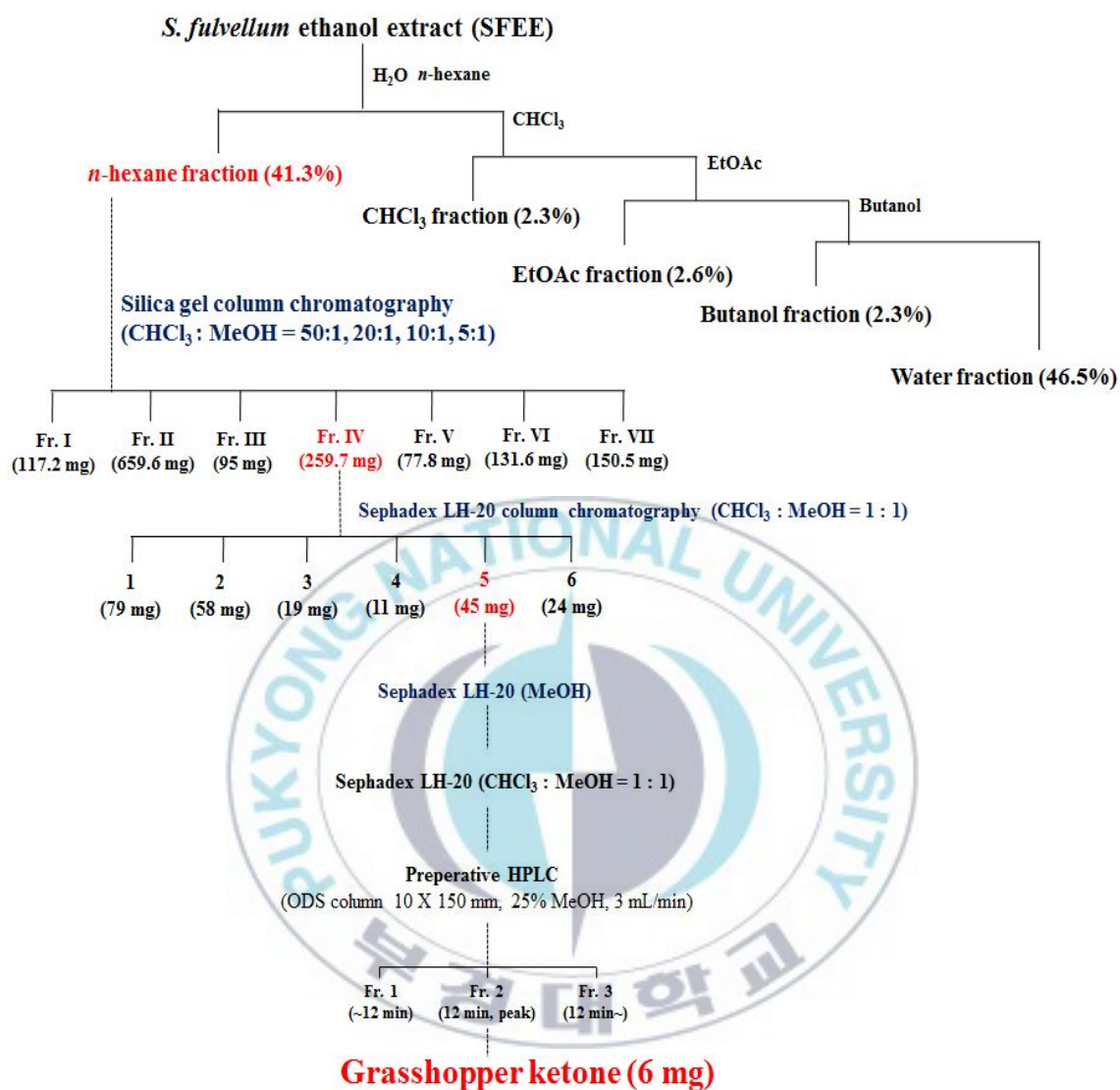


Fig. 1. Procedure for the purification of a bioactive compound, grasshopper ketone, from *Sargassum fulvellum* ethanol extract.

3-3. 정제물의 구조 분석

참모자반 에탄올 추출물의 Hex층에서 분리한 CMB-2 (Fr. 2)의 화학 구조를 구명하기 위하여 600 MHz FT-NMR Spectrometer(JNM-ECA600, Jeol, Japan)를 사용하였으며, 분자량 분석을 위하여 LC/MS spectrometer(Agilent1100, Agilent, USA)를 사용하였다.

5. 통계처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software(SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test법에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 염증 억제 효과

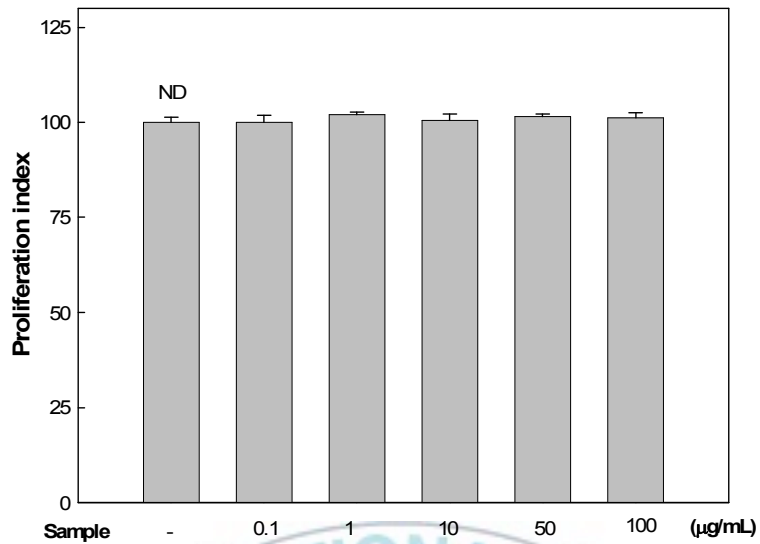
1-1. 세포 독성 측정

참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 대식세포에 대한 세포독성을 살펴보고 항염증 효과 탐색을 위한 농도 조건 설정을 위해 RAW 264.7 세포에 대해 MTT assay를 실시하였다. 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 0.1, 1, 10, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가하여 배양한 결과(Fig. 2A, B), RAW 264.7 세포의 증식능이 모든 처리 농도에서 negative control에 비해 유의적인 차이를 보이지 않아 세포 독성을 가지지 않음을 확인하였다. 이는 Park 등(Park et al., 2014)이 황금 열수

추출물 첨가 시 RAW 264.7 세포 증식능이 negative control과 유의적인 차이를 가지지 않아 세포 독성이 없다고 보고한 결과와 동일하다. 따라서 이후의 RAW 264.7 세포를 이용한 항염증 효과 측정 실험에서 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 실험을 진행하였다.



(A)



(B)

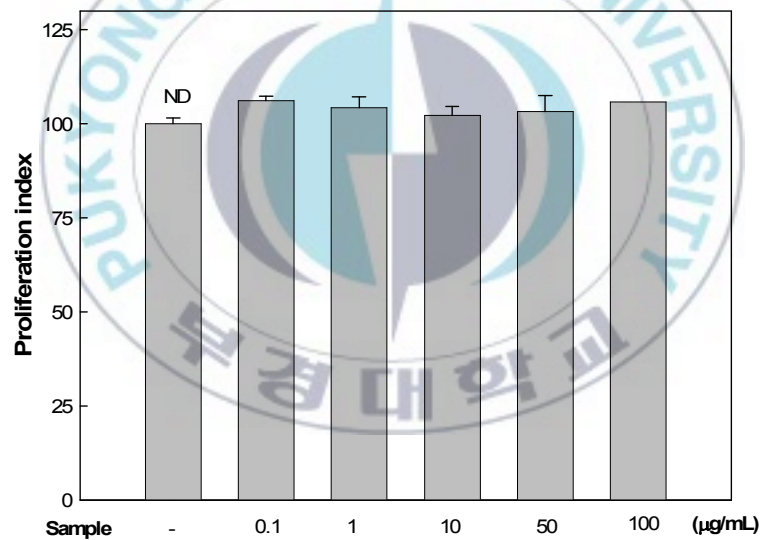


Fig. 2. Effect of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (A) and tuna heart ethanol extract (B) on the proliferation of RAW 264.7 cells.

Proliferation index (%) = (sample O.D./control O.D.)*100.

NDMeans not significantly different ($p < 0.05$).

1-2. Nitric Oxides 생성 억제 효과

NO는 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되는 과정에서 iNOS의 작용에 의해 생성되는 반응성이 강한 이원자 자유라디칼이다(Yum, 2009). 이러한 NO는 생체 내에서 혈관 확장에 관여하여 혈압을 조절하고, 세포 간 혹은 세포내의 신호전달이나 항균 작용과 같은 다양한 생리기능을 통해 신경 전달을 매개하거나, 생체 방어역할을 하는 것으로 체내에서 매우 중요한 역할을 한다(Han et al., 2014b; Kubes, 2000; Schmidt & Walter, 1994). 그러나 지속적인 염증반응에 의해 과잉으로 생성된 NO는 수 초가 지나면 nitrite(NO_2), nitrate(NO_3)등의 안정한 화합물로 존재하게 되며, 이 과정 중 생성되는 peroxynitrite anion(ONOO^-)가 염증을 일으키고(Castillo et al., 1995; Southan & Szabo, 1996), 세포 내 독소작용을 야기하여 조직 손상을 유발할 뿐만 아니라, 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 동반한 염증 반응을 촉진시킨다(Kubes, 2000). 또한 NO는 2형 동위효소인 COX-2를 활성화시킴으로써 염증성 물질인 prostaglandin E_2 (PGE_2)의 생성을 촉진하여 염증 반응을 심화시킨다(Han et al., 2014a). 따라서 NO의 과도한 생성을 억제하는 것이 염증 억제의 주요 목표로 인식되고 있다.

이에 본 연구에서는 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 처리에 의한 NO 생성 억제 효과를 살펴보기 위해 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화 시킨 후 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 생성된 NO를 griess 시약을 이용하여 측정하였다. 참모자반의 경우(Fig. 3A), 참모자반 에탄올 추출물 첨가 농도 의존적으로 NO 분비량이 현저히 감소하는 것을 확인하였으며,

특히 LPS 단독 처리 시 $16.42 \pm 0.50 \mu\text{M}$ 의 분비량을 보였으나, 참모자반 에탄올 추출물을 $50 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시 비해 $3.22 \pm 0.50 \mu\text{M}$ 의 분비를 보여 약 80%의 우수한 NO 분비 억제 효과를 가지는 것을 확인하였다. 이는 모자반속 모자반과에 속하는 다른 갈조류인 팽생이 모자반 에탄올 추출물의 처리에 따라 NO 분비가 감소된 결과(Lee, 2010)와, 외톨개 모자반으로부터 분리한 fucoxanthin이 높은 NO 억제능을 가진 연구 결과와 동일하였다(Heo et al., 2010). 에탄올은 물, 아세톤 등과 함께 대표적인 극성 용매로, 일반적으로 에탄올에는 소수성 물질과 친수성 물질이 모두 용출되는 것으로 보고된 바 있는데(Lee et al., 2009), 특히 갈조류의 대표적 지용성 색소인 fucoxanthin은 자유 라디칼 반응에 의한 활성 산소로부터 세포와 조직을 보호하는 주요 물질로 알려져 있으며(Giovannucci, 1999), 또한 갈조류에 풍부한 수용성 다당류인 fucoidan이 RAW 264.7 세포에서 NO 생성과 iNOS 발현을 억제한다는 보고(Kim et al., 2008a)로 미루어볼 때, 이러한 성분이 갈조류인 참모자반의 NO 생성 저해효과에 영향을 미친 것으로 사료된다.

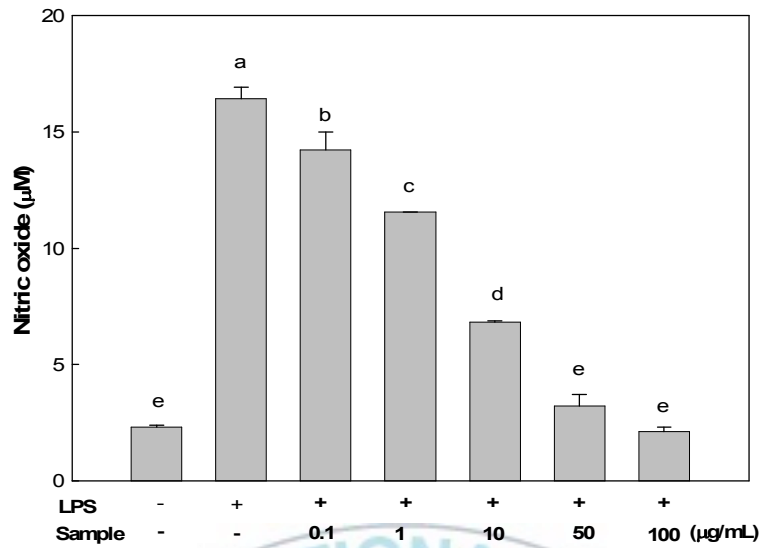
다음으로 참치심장 에탄올 추출물의 경우(Fig. 3B), negative control에서는 $2.87 \pm 0.54 \mu\text{M}$ 로 낮은 분비량을 보였으나, LPS 첨가 시 $12.57 \pm 0.85 \mu\text{M}$ 로 높은 분비량을 보였다. 참치심장 에탄올 추출물을 농도별로 첨가 시 농도 의존적으로 분비량이 현저히 감소됨을 확인하였으며, 특히 $50 \mu\text{g/mL}$ 이상의 농도로 처리 시 NO 분비량에서 아무 처리도 하지 않은 negative control과 유의적인 차이를 보이지 않아 우수한 항염증 효과를 가짐을 확인하였다. 현재까지 참치의 항염증 효과에 대한 연구는 참치에서 분리한 eicosapentaenoic acid (C20:5, EPA)

와 docosahexaenoic acid (C22:6, DHA)를 이용한 연구가 주를 이루고 있다(Khair-El-Din et al., 1996; Lo et al., 1999; Weldon et al., 2007). 그러나 본 연구에서 사용된 참치 심장의 경우 대부분이 단백질 성분으로 구성되어 있으며, EPA, DHA와 같은 지질 성분의 함량은 매우 낮게 측정되었다(Table 1).

현재까지 참치 심장의 단백질 조성에 대한 고찰은 보고된 바 없으나, 어류에는 다양한 생리활성 peptide가 함유되어 있으며(Erdmann et al., 2008), 이들 생리활성 peptide는 체내에서 호르몬 기능과 같은 생체 system을 조절하는 것으로 알려져 있다(Meisel & FitzGerald, 2003). Cheong (2007)은 참치 자숙액에서 항산화 활성을 가지는 peptide인 L-anserine과 L-carnosine을 분리 정제하였으며, 특히 Hwang 등(2012)과 Lee 등(2012)는 각각 참굴과 바지락의 해양 생물 유래 peptide가 LPS 유도 RAW 264.7 cell의 염증 반응에서 NO 생산을 억제하여 항염증 효과를 가진다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서 나타난 참치 심장 에탄올 추출물의 항염증 효과는 참치 심장에 다량 함유된 단백질 유래 peptide 성분에서 기인한 것으로 사료된다.

(A)



(B)

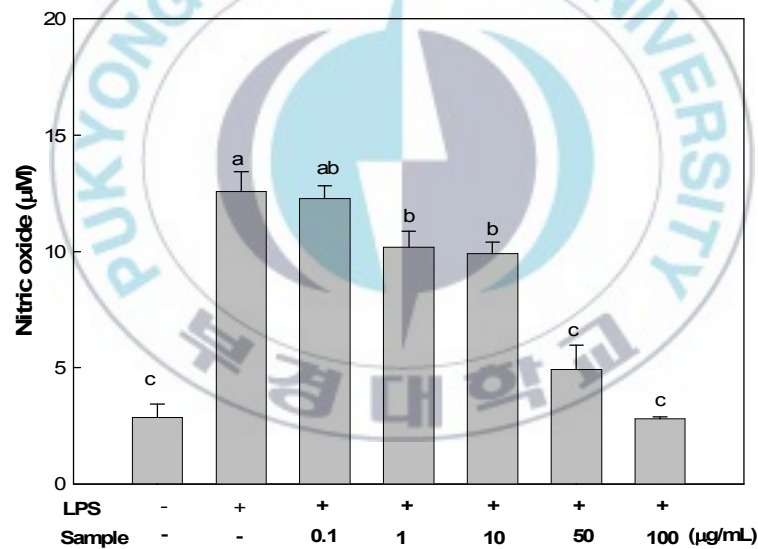


Fig. 3. Inhibitory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (A) and tuna heart ethanol extract (B) on production of nitric oxides in RAW 264.7 cells.

^{a-e}Means with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

1-3. 염증 관련 cytokines 생성 억제 효과

체내에서 염증 반응이 일어나면, NO, PGE₂ 등과 같은 염증 매개 인자 이외에도 면역 반응에서 신호전달의 역할을 하는 단백질인 염증성 cytokine이 분비되는데, 대표적인 pro-inflammatory cytokine에는 IL-6, TNF- α 및 IL-1이 있다(Kim et al., 2013a). 이러한 염증성 cytokine은 초기 염증 반응에 관여하고 있는 것으로 알려져 있는데(Tizard, 1986), 그람음성균의 세포벽 성분인 LPS는 TNF- α , IL-6와 같은 cytokine의 발현을 촉진하고, 그 결과 iNOS, COX-2와 같은 단백질 발현이 증가함에 따라 NO, PGE₂가 생성됨으로써 염증이 심화되게 된다(Kiemer et al., 2003). 이러한 cytokine 중 IL-6는 단핵구, 대식세포, 활성화된 림프구 등과 같은 여러 세포에서 분비되는 것으로 B 세포가 plasma 세포로 분화되는 단계를 활성화시킴으로써 항체 분비를 촉진시켜 급성 염증 반응을 만성 염증 반응으로 전환시키는 역할을 하며(Hibi et al., 1996; Kim et al., 2011a; Wang et al., 2013), 과잉 생산 시 감염성 질환, 자가 면역 질환, 악성 종양 등의 여러 질병을 유발하며, 이러한 질병에서 분비량이 증가하는 것으로 알려져 있다(Chae et al., 2007; Delgado et al., 2003). TNF- α 는 종양괴사인자라고도 하며, 단핵구, 대식세포 및 비만세포에서 발생하는 것으로, 염증개시 및 유지에 핵심적 작용을 하여 염증성 병변에서 증가된 발현을 보이는 것으로 만성 염증질환과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Djeu et al., 1988, Kim & Son, 2012; Park et al., 2014; Moon et al., 2013). 이러한 TNF- α 는 내분비 및 외분비계를 통해 자신과 다른 대식세포의 TNF- α 수용체에 ligand로 결합하여 염증 매개 전사인자인 NF- κ B의 p50/p65를 활성화시켜

TNF- α 및 IL-6의 cytokine과 iNOS, COX-2와 같은 염증 매개 인자의 발현을 증가시켜 염증을 심화시킨다(Tracey et al., 2008; Giuliani et al., 2001; Medzhitov, 2008; Tak & Firestein et al., 2001). 이러한 TNF- α 의 국소적 증가는 열, 부종, 발적, 통증 등의 염증 반응의 기본적인 임상 징후를 일으키지만, 전신적 증가는 미세 혈관의 혈전, 모세혈관 누출을 유발시켜 심장 박출량을 억제하여 극심한 조직의 손상을 가져온다(Lee et al., 2003). 때문에 많은 연구들에서 TNF- α 의 조절을 통한 염증성 질환의 치료법을 제시하고 있다(Tracey et al. 1998; Beutler et al., 1989, Kim et al., 2011b; Wang et al., 2013). 마지막으로 IL-1 β 는 IL-6 및 TNF- α 와 함께 대표적 염증성 cytokine으로 다양한 염증성 자극 요인에 의하여 활성화된 단핵구, 대식세포, B 세포, 수지상세포 등에서 분비되는 것으로, B 세포의 성숙, T 세포의 활성화 및 NK세포의 활성화에 관여하여 면역계를 자극하며, 염증반응에서 NO 생성을 유도하고, 시상하부에 작용하여 발열증상을 유도하는 cytokine이다(Kim et al., 2011a; Chae et al., 2007; Delgado et al, 2003, Masters & Simon, 2009).

따라서 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물이 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후, 추출물을 농도별로 처리하여 ELISA 방법으로 분비량을 측정하였다. 그 결과, 참모자반 에탄올 추출물의 처리에 따라 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 모두 농도 의존적으로 분비량이 감소함을 확인하였다. 특히 IL-6 및 IL-1 β 의 경우(Fig. 4A, 6A), positive control인 LPS 처리구에 비해 참모자반 에탄올 추출물을 비교적 낮은 농도인 10 μ g/mL의 농도로

처리 시에도 40% 이상의 감소를 보였으며, 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시, 분비량이 각각 35.88 ± 11.10 , 10.91 ± 1.73 pg/mL 으로, LPS 단독 처리시 각각 350.27 ± 5.55 , 69.76 ± 0.00 pg/mL 을 나타낸 것과 비교해볼 때 약 89%, 84%의 감소효과가 있음을 확인하였다. TNF- α 의 경우(Fig. 5A), LPS 단독 처리시 $1,733.56 \pm 68.89$ pg/mL 의 분비량을 보인 것에 비해 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리 시 143.21 ± 8.83 pg/mL 으로 90% 이상의 감소를 보여 참모자반 에탄올 추출물이 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 감소에 큰 효과가 있음을 확인하였다. 참치심장 에탄올 추출물의 경우, IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 분비를 첨가 농도 의존적으로 감소시킴을 확인하여 항염증 효과를 확인하였다. 먼저 IL-6 및 TNF- α 분비량에서 LPS 단독 처리 시 각각 373.83 ± 6.82 , $2,345.34 \pm 34.46$ pg/mL 의 높은 분비량을 보였으나, 참치심장 에탄올 추출물을 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시 각각 110.60 ± 4.88 , 676.31 ± 40.20 pg/mL 으로 나타나 70% 이상의 감소율을 보였으며(Fig. 4B, 5B), IL-1 β 의 경우(Fig. 6B), LPS 단독 처리 시 50.14 ± 3.47 pg/mL 의 분비량을 보였으나, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시 50% 이상의 감소율을 보였으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시 76%의 감소율을 보여 항염증 효과를 가짐을 확인하였다.

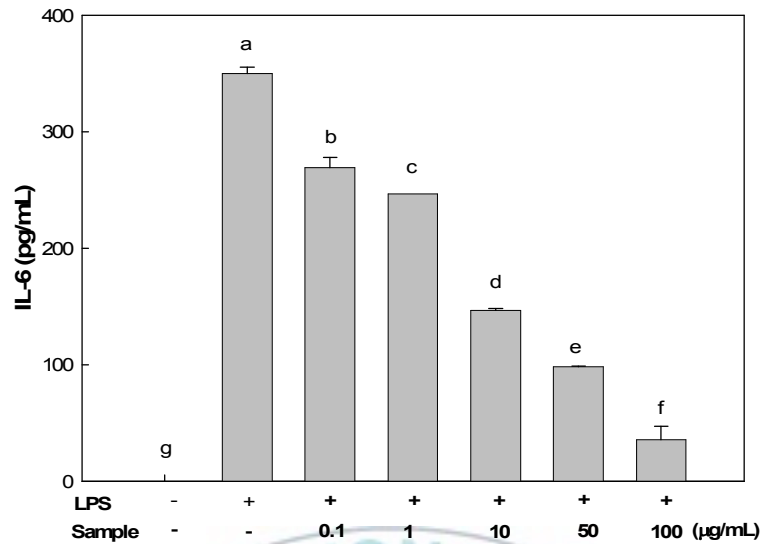
일반적으로 급성기 염증 반응에서 TNF- α 및 IL-1 β 는 상호 작용을 통하여 급격히 증가하는 것으로 알려져 있는데(Mathiak et al., 2000), 본 연구에서 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물은 LPS에 의해 유도된 급성기 염증 반응에서 TNF- α 및 IL-1 β 의 분비를 함께 억제하는 것을 확인하였다. 이는 썸바귀 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 항염증 효과 실험에서 TNF- α 의 분비량이 추출물 첨가 농도 의존적으로 감소하

였으며, 이에 따라 IL-1 β 의 분비량 또한 감소시킨 결과와 유사하였으며(Lee, 2011), 짝잎모자반 추출물의 경우에도 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 모두에 억제 효과를 보인 결과와 유사하였다(Hwang et al., 2011).

이상의 결과로 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 처리는 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β cytokine의 효과적인 분비 억제효과를 가지며, 이에 따라 우수한 항염증 효과를 가짐을 확인하였다.



(A)



(B)

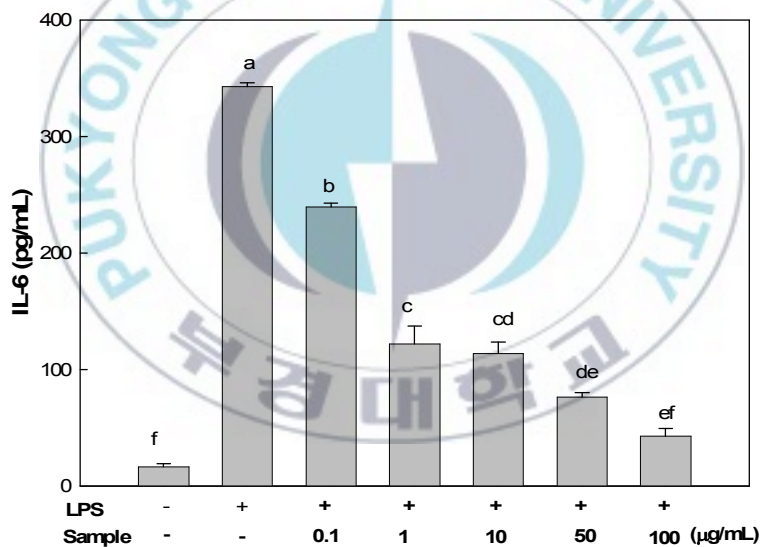
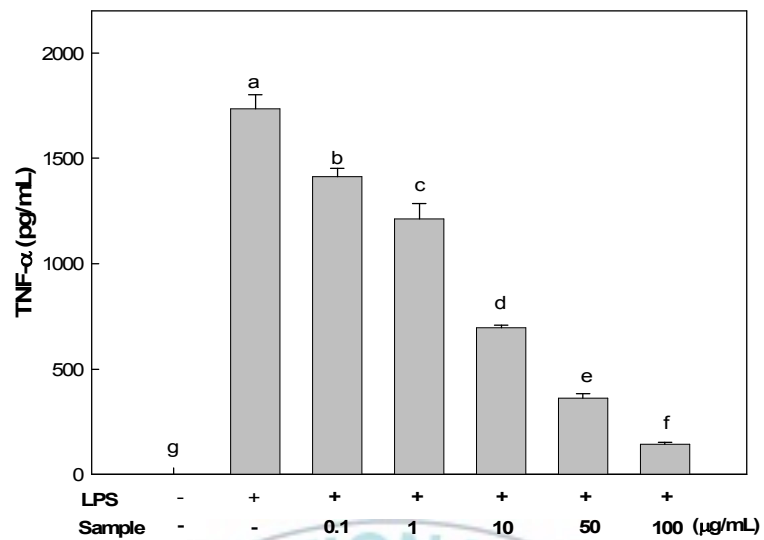


Fig. 4. Inhibitory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (A) and tuna heart ethanol extract (B) on production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

^{a-f}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

(A)



(B)

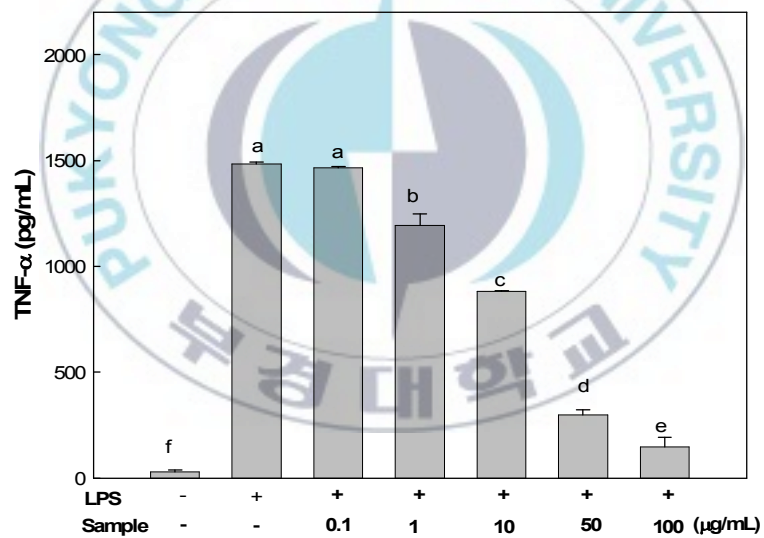
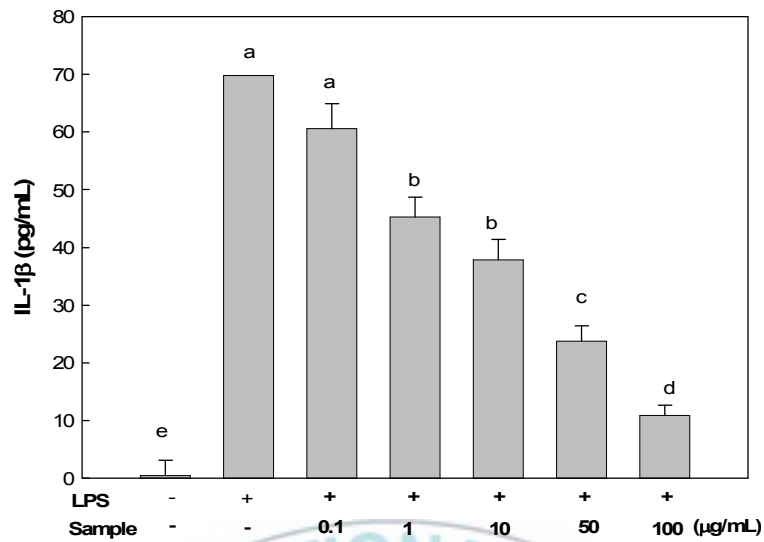


Fig. 5. Inhibitory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (A) and tuna heart ethanol extract (B) on production of TNF- α in RAW 264.7 cells.

^{a-f}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

(A)



(B)

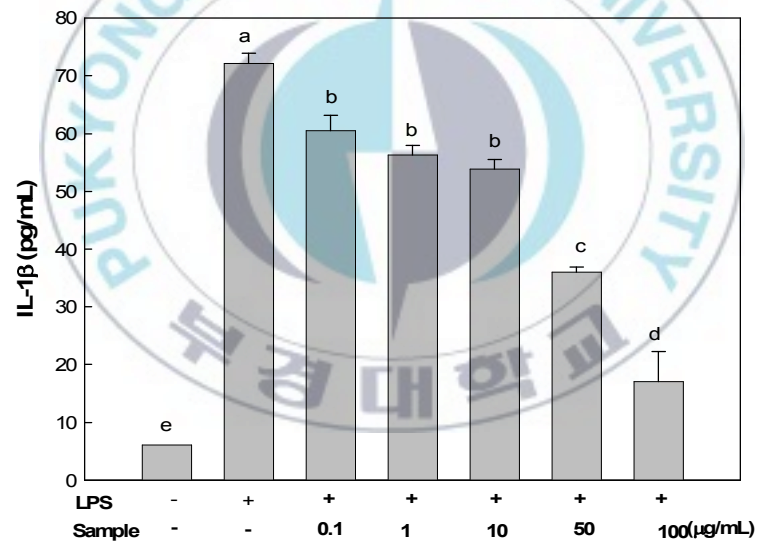


Fig. 6. Inhibitory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (A) and tuna heart ethanol extract (B) on production of IL-1 β in RAW 264.7 cells.

^{a-e}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

1-4. iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현 억제 효과

일반적으로 mammalian cell에는 type I, II, III의 3가지 iso-form의 NOS가 존재하며 type I (nNOS, neuronal NOS)와 type III(eNOS, endothelial NOS)는 세포내에서 지속적으로 존재하기 때문에 cNOS(constitutive NOS)로 분류되나, type II인 iNOS(inducible NOS)는 LPS, cytokine과 같은 특정 자극인자에 노출 시에만 발현된다. nNOS나 eNOS와는 달리 iNOS는 LPS나 interferon- γ (IFN- γ) 등의 다양한 염증성 자극에 의해서만 간세포, 혈관의 평활근세포, 섬유아세포, 마우스 대식세포 등의 세포에서 합성되고 다량의 NO를 생성한다 (Moncada et al., 1991). 따라서 염증 반응이 일어나면 관련 세포로부터 iNOS의 발현이 증가하는데, 이는 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 과도하게 생성된 NO는 혈관을 확장시키고, 유전자 변이, 신경손상 및 부종 등의 염증반응을 촉진시킴과 동시에 염증 매개체의 생합성을 촉진함으로써 염증반응을 더욱 심화시킨다(Kim et al., 2002b; Tezuka et al., 2001; Yun et al., 1996).

다음으로 COX는 Arachidonic acid를 prostaglandins(PGs)으로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 정상적인 체내의 모든 세포에 존재하면서 혈소판 형성, 위벽 보호, 신장 기능 유지 등의 정상적인 생체 기능의 항상성 유지의 기능을 하지만, COX-2는 급성 염증 반응에서 LPS 및 cytokine 등에 의해 연골세포나 활액세포에서 유도되어 염증 매개 물질인 prostaglandins를 형성하여 통증 및 각종 염증반응을 유발한다(Duerksen-Hughes et al., 1992; Hume and Wells, 2007; Lin et al., 2005; Kang et al., 2013). 따라서 각종 COX-2

저해제가 대표적 소염 진통제로 이용되고 있으며, 이에 따라 염증성 질환의 치료를 위해 NO와 PGE₂의 과도한 발생을 억제하기 위해 그 up-stream 단계인 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하는 것이 중요한 목표로 인식되고 있다(Hseu et al., 2005; Camacho-Barquero et al., 2007).

이러한 iNOS 및 COX-2 발현은 up-stream 단계의 전사인자인 NF- κ B의 활성화에 의해 유도되는데, 이러한 NF- κ B는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 전사인자로(Ghosh & Hayden, 2008), p50과 p65의 이량체로 구성되며 정상 상태에서는 I κ B와 결합함으로써 불활성화 상태로 존재하나, LPS 등의 자극에 의해 세포 표면의 toll-like receptor 4/myeloid differentiation primary response gene 88 (TLR4/MyD88) 경로를 통해 활성화 된 inhibitor kappa B kinase (I κ k)에 의해 I κ B와의 결합이 끊어지면서 핵 내부로 들어가 iNOS, COX-2 및 염증 관련 cytokine을 합성을 유도하는 전사인자의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Majdalawieh & Ro, 2010). 따라서 염증반응에서 생성되는 물질 중 iNOS, COX-2, NF- κ B와 같은 단백질의 발현 억제효과를 확인하여 항염증 효과 물질이 어떤 염증성 신호전달 경로를 차단하여 항염증 효과를 가지는지를 알 수 있다.

본 연구에서 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물이 가지는 항염증 효과에 대한 기작을 알아보기 위하여 추출물을 농도별로 처리하여 iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량을 측정하였다. Control로는 대표적인 housekeeping gene인 β -actin을 측정하였다. Negative control에서는 각 단백질 밴드가 거의 관찰되지 않았으나, LPS 처리한 positive

control에서 단백질 발현이 급격히 증가함을 확인하였으며, 참모자반 에탄올 추출물 처리에 의해 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현량이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 7A-C). 특히 100 μ g/mL의 농도로 처리 시 각각 87%, 65% 및 50%의 억제 효과를 가짐을 확인하였다. 이와 동일한 결과로, Jin 등(2010)의 마 추출물에 대한 연구와, Kim 등(2007a)의 탕자나무에서 분리한 poncirin 및 Kim 등(2008b)의 감초뿌리에서 분리한 isoliquiritigenin의 항염증 효과에 대한 연구에서도 각 시료의 첨가에 의해 iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 관찰하여, 이를 통해 항염증 효과를 가진다고 보고하였다.

또한 참치심장 에탄올 추출물을 처리한 경우(Fig. 8A-C), iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현량이 추출물 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 100 μ g/mL으로 처리 시 각각의 발현량을 대조구에 비해 약 38%, 61%, 60% 억제함을 확인하였다. 참치 심장 에탄올 추출물의 이러한 효과는 높은 함량의 단백질 성분에서 기인한 것으로 사료되며, 최근 다수의 연구자들이 항염증 효과를 가지는 peptide에 대해 주목하고 있다. Lin 등(2010)은 새우 유래 peptide가 NF- κ B 활성을 저해하여 TNF- α 분비를 억제한다고 보고하였다. 유사한 결과로 Park 등(2004)은 melittin이 LPS 유도 염증 반응에서, I κ B의 활성 억제에 의한 NF- κ B subunit의 핵 내로의 이동과 DNA 결합 활성을 저해하여 iNOS, COX-2, cytosolic phospholipase A₂ 단백질 발현과 PGE₂, NO의 생성을 감소시켜 항염증 효과를 가진다고 보고하였다. 또한 Ahn 등(2015)은 연어 가슴지느러미 단백질의 가수분해산물인 tripeptide가 iNOS, COX-2, NO 및 PGE₂를 억제하고, IL-6, TNF- α , IL-1 β 생산을 저해하

는 기작을 통해 항염 효과를 가진다고 하였다.

따라서 이러한 결과를 종합해 볼 때, 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물이 LPS에 의해 일어나는 NF- κ B의 활성화 억제를 통해 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시킴으로써 결과적으로 NO 및 PGE₂와 같은 염증 매개인자 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 가지는 것으로 사료된다.



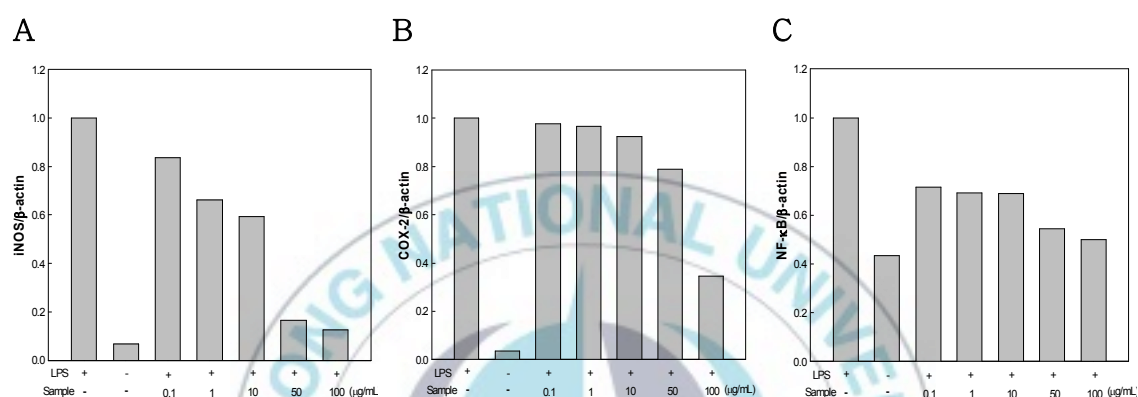
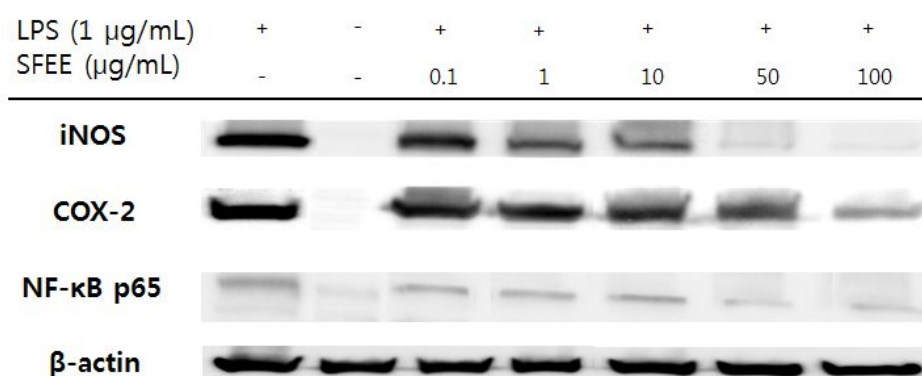


Fig. 7. Inhibitory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (SFEE) on the protein expression of iNOS (A), COX-2 (B), and NF-κB (C) in RAW 264.7 cells. The levels of iNOS and COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF-κB in nuclear protein were determined by a western blot analysis.

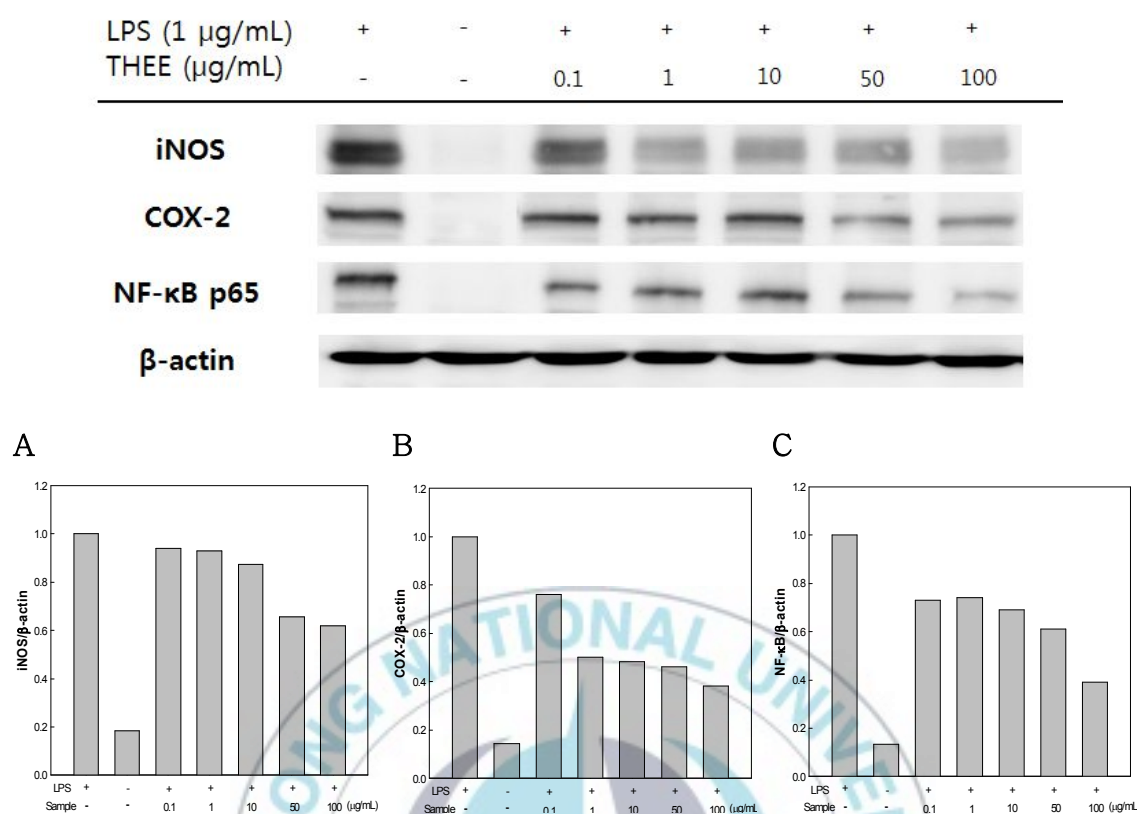


Fig. 8. Inhibitory effects of tuna heart ethanol extract (THEE) on the protein expression of iNOS (A), COX-2 (B), and NF- κB (C) in RAW 264.7 cells. The levels of iNOS and COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF- κB in nuclear protein were determined by a western blot analysis.

1-5. MAPKs 발현 억제 효과

대식세포에서 LPS의 자극에 의해 일어나는 염증반응의 경로에는 TLR4/MyD88/NF- κ B 경로 이외에도 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 경로가 있다. LPS 자극에 의한 MAPKs의 인산화는 하위의 activator protein-1 (AP-1), cAMP responsive element binding protein, activating transcription factor-2, NF- κ B와 같은 전사 인자의 serine 및 threonine 잔기의 인산화를 시켜 활성화시키는 핵심 신호 전달 분자로, 포유류에서는 주로 c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), extracellular signal regulated kinase (ERK), p38 protein kinase (p38)이 알려져 있다(Johnson & Lapadat, 2002; Dong & Davis, 2002).

참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 항염증 작용이 MAP kinases 경로 억제와 관련성이 있는지를 확인하기 위하여 LPS로 염증 반응을 유도한 RAW 264.7 세포에 추출물을 처리하여 JNK, ERK, p38의 인산화 정도를 Western blot analysis를 통하여 분석하였다. 그 결과, 참모자반 에탄올 추출물의 경우(Fig. 9A-C), p38, ERK 및 JNK의 인산화를 참모자반 에탄올 추출물 첨가 농도 의존적으로 억제함을 확인하였으며, 특히 100 μ g/mL의 농도로 처리 시 각각 57%, 70%, 57%의 억제 효과를 보임을 확인하였다. 이와 유사한 결과로, Joung 등 (2012)은 참모자반과 같은 갈조류의 일종인 외톨개 모자반의 에틸아세테이트 분획물이 특히 p-ERK의 발현을 억제하여 항염증 효과가 있다고 보고하였다.

참치 심장 에탄올 추출물의 처리에 따른 효과를 살펴본 결과(Fig. 10A-C)에서도 세포질 내의 p-p38, p-ERK, p-JNK 발현이 농도 의존적

으로 억제됨을 확인하였으며, 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 처리 시 각각 30%, 43%, 43%의 억제 효과를 가짐을 확인하였다. 유사한 결과로, Kim 등 (2015)은 LPS로 유도한 RAW 264.7 cell의 염증 반응에서 tat-biliverdin reductase A 단백질이 세포 내로 침투하여 p38, JNK, ERK의 인산화를 억제하는 기작을 통해 COX-2, iNOS 및 cytokine 발현을 억제하였다고 보고하였다.

위의 결과를 종합해 볼 때, 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물이 LPS에 의해 일어나는 MAPKs의 인산화 억제를 통해 우수한 항염증 효과를 가지는 것을 확인하였다.



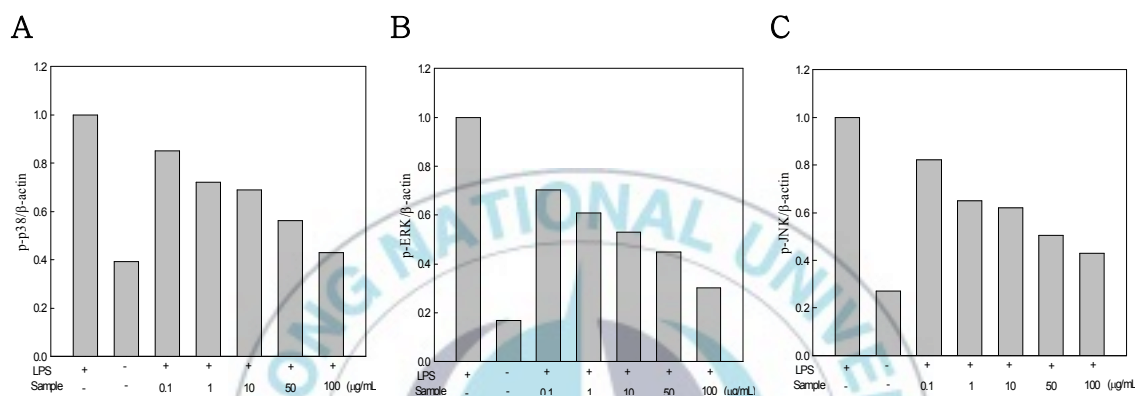
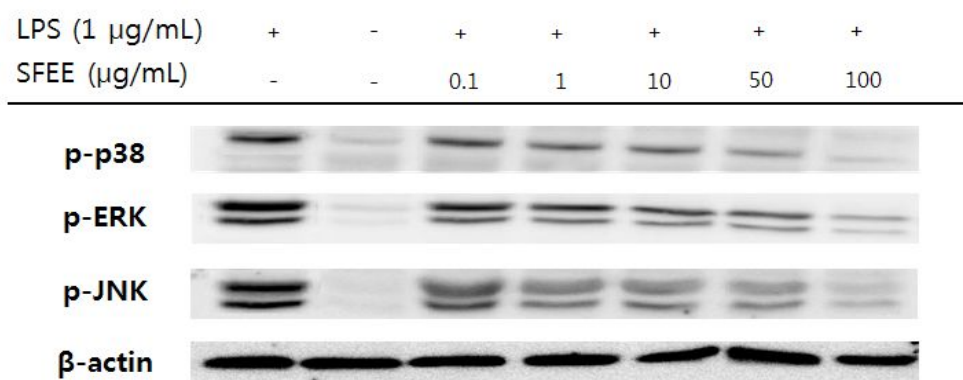


Fig. 9. Inhibitory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (SFEE) on the of MAPKs in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of phospho-p38 (p-p38) (A), p-ERK (B), and p-JNK (C) were determined by a western blot analysis.

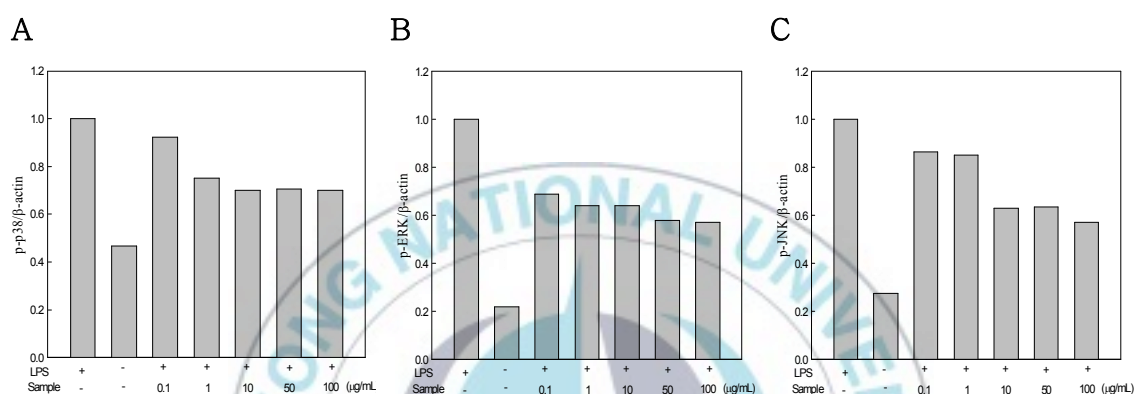
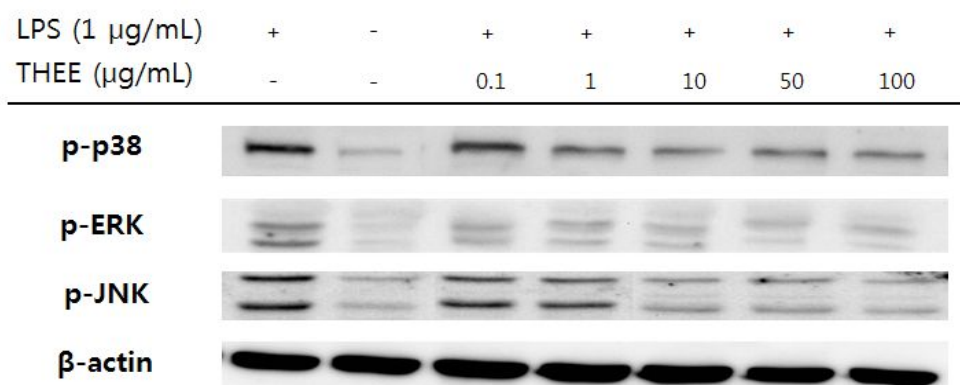


Fig. 10. Inhibitory effects of tuna heart extract (THEE) on the phosphorylation of MAPKs in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of phospho-p38 (p-p38) (A), p-ERK (B), and p-JNK (C) were determined by a western blot analysis.

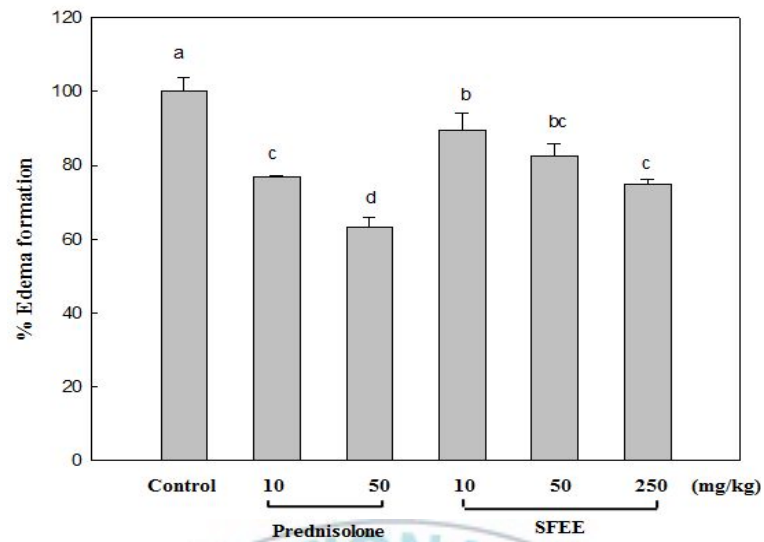
1-6. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

염증반응은 외부로부터 가해지는 손상 및 감염에 대한 생체 및 조직의 일차적 보호 작용으로, 물리화학적 및 면역학적 인자들의 상호작용에 의해 발생하여 발적, 발열, 부종, 통증 및 기능장애 등을 동반한다(Jeong et al., 2012). 이러한 염증반응은 손상된 부위를 복구시키려는 기전으로 일어나며, 혈관확장이나 부종 등은 피부염증에서 가장 대표적인 반응이다. 염증이 유발되면 혈관확장으로 인해 혈류량이 증가함에 따라 발열 및 발적이 나타나고, 혈관 내부에 존재하던 neutrophils 및 mast cell 등이 혈관 외부의 염증부위 조직으로 침윤함으로써 부종 증상 및 cytokine, prostaglandins 증가를 일으켜 다른 면역세포들을 활성화시킴과 동시에 통증을 유도하게 된다(Park et al., 2014). 따라서 특정 약리물질의 항염증 효과를 증명하기 위하여 염증을 유도한 피부조직의 두께 및 면역세포의 침윤에 미치는 물질의 영향을 관찰하여 이 반응을 억제하는 효과를 검증하는 실험이 행해지고 있다(Ju et al., 2010; Hahm et al., 2008). 따라서 본 연구에서는 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg의 농도로 200 μ L씩 경구 투여한 후, croton oil로 염증을 유발하고 귀 두께를 측정하였다. Croton oil의 국소적 적용은 염증세포의 침윤을 동반한 급성부종을 초래하고, 조직학적으로는 투여 부위에 국소적 염증세포 침윤을 동반한 피부조직의 부종이 관찰되는 것으로 알려져 있다(Veras et al., 2013; Mo et al., 2013).

참모자반 에탄올 추출물의 경우(Fig. 11A), control구와 비교하여 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소함을 확인하였으며 특히 250

mg/kg의 농도에서 positive control구인 prednisolone 50 mg/kg 처리구와 비교하였을 때 유사한 효과를 나타냄을 확인하였다. 이는 조직관찰 결과에서도 나타났는데, croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에서 croton oil만을 처리한 경우에 비해 참모자반 에탄올 추출물을 100 mg/mL의 농도로 도포한 경우 prednisolone 0.8 mg/ear 처리구와 유사한 정도로 경피 및 진피두께가 얇아진 것을 확인하였으며(Fig. 12A), toluidine-blue 염색을 통해 조직 내의 mast cell 침윤 정도를 확인한 결과(Fig. 12B) 참모자반 에탄올 추출물의 처리가 mast cell 침윤을 현저히 억제함을 확인하였다. 다음으로 참치 심장 에탄올 추출물의 경우에도 마찬가지로 처리 농도 의존적으로 유의적인 귀 부종 발생을 억제 효과를 확인하였으며 mast cell 침윤도 효과적으로 억제한 것을 확인하였다(Fig. 11B, 13). 통증 완화 및 염증 치료제로 주로 사용되는 비스테로이드계 소염진통제는 위궤양이나 위점막 손상과 같은 여러 가지 부작용을 가지는 것으로 보고된 바 있으며(Dogne et al., 2006; Makins & Ballinger, 2003), 따라서 최근에는 천연물로부터의 안전성이 보장된 새로운 항염증 치료제의 탐색이 활발히 진행되고 있다. 본 연구의 귀 부종 억제에 대한 실험 결과로 미루어 보아, 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물은 마우스 모델에서의 염증 반응에 의한 부종의 완화에 우수한 효과가 있는 것으로 나타났으며, 염증 치료제의 소재로써의 활용 가치가 충분할 것으로 사료된다.

(A)



(B)

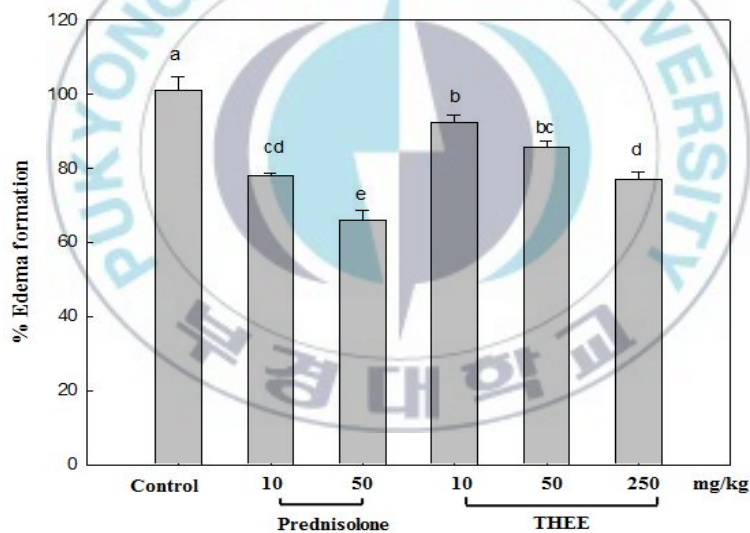


Fig. 11. Inhibition of *Sargassum fulvellum* ethanol extract (A) and tuna heart ethanol extract (B) against croton oil-induced mouse ear edema. ^{a-c}Means with different superscript are significantly different ($p<0.05$).

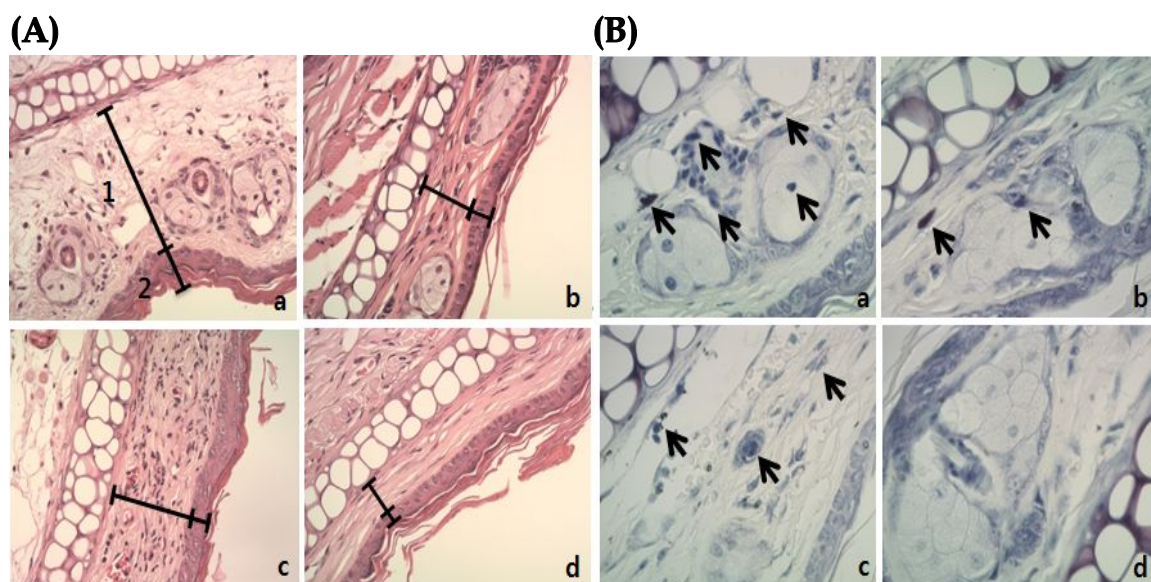


Fig. 12. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of croton oil 5% (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d), stained with (A) hematoxylin-eosin and (B) toluidine-blue examined under light microscopy (magnification: 200×). Treatments(20 μ L): vehicle 2% tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b) and *Sargassum fulvellum* ethanol extract 2 mg/ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrow in (B) means infiltration of mast cells.

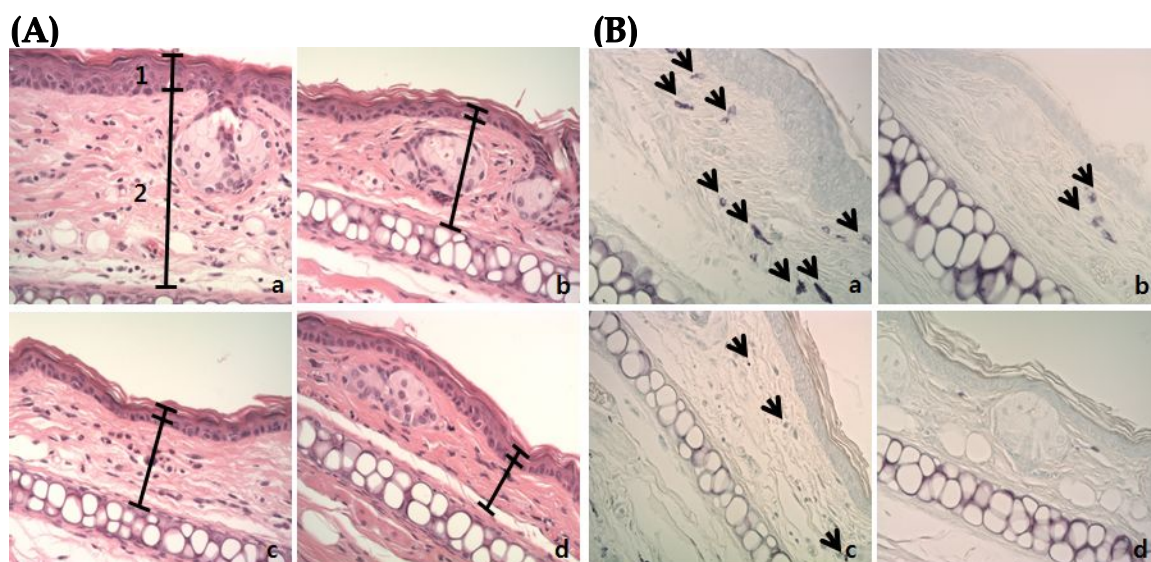


Fig. 13. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of croton oil 5% (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d), stained with (A) hematoxylin-eosin and (B) toluidine-blue examined under light microscopy (magnification: 200×). Treatments(20 μ L): vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b) and tuna heart ethanol extract 2 mg/ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrow in (B) means infiltration of mast cells.

1-6. 단기 독성 평가

앞서 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 참모자반 및 참치 심장 에탄올 추출물이 우수한 항염증 효과를 가지는 것을 확인하였다. 이에 대해 그 독성과 부작용에 대한 과학적 검증을 통해 향후 새로운 기능성 식품 소재의 개발을 위한 가능성을 확인하기 위해 단회 경구 투여 독성시험을 실시하였다. 식약처 고시에 따르면 강제 경구 투여 시 기술적으로 투여하는 용량은 1,000~2,000 mg/kg이나, 예외적인 경우에는 5,000 mg/kg까지 투약이 가능하다. 따라서 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성에 대해 알아보기 위하여 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 300, 2000 및 5000 mg/kg 농도로 200 μ L씩 경구 투여한 후 2주간 행동변화 및 치사율을 관찰하였다(Table 2). 경구 투여 후 4시간 까지 이상행동을 관찰 시 모든 농도에서 이상행동이 관찰되지 않았으며, 2주간 이를 간격으로 관찰한 결과 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 모든 시험 군에서 사망동물은 없었으며, 따라서 치사율에 대한 영향은 없는 것으로 나타났다. 유사한 연구 결과로 Seok 등(2014)은 백선피 추출물, Jung(2014)은 조위승청탕, Han 등(2014a)은 오미자 종자 정유의 단회 경구 투여 독성연구에서 경구 투여 후 2주간의 관찰 기간 중 이상행동 및 사망동물이 관찰되지 않아 독성이 없는 것으로 보고하였다. 따라서 동물실험을 통해 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물이 5,000 mg/kg 농도에서도 무해할 것으로 사료되며, 이를 토대로 안전한 기능성 식재료 또는 건강 기능 식품의 원료로서의 이용이 가능할 것으로 사료된다.

Table 2. Mortality of mice treated orally with *Sargassum fulvellum* ethanol extract and tuna heart ethanol extract

			Days after treatment							
			0	2	4	6	8	10	12	14
Control			0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
300 mg/kg·body weight	SFEE ¹⁾		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	THEE ²⁾		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg·body weight	SFEE		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	THEE		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5000 mg/kg·body weight	SFEE		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	THEE		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

¹⁾*Sargassum fulvellum* ethanol extract.

²⁾Tuna heart ethanol extract.

2. 참모자반 에탄올 추출물로부터 **Grasshopper ketone**의 분리 및 정제

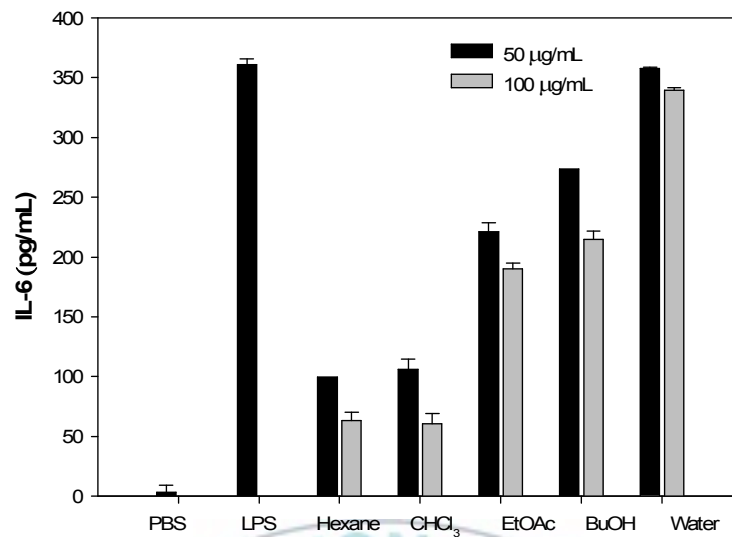
2-1. 계통분획에 의한 참모자반 추출물의 분획별 활성

참모자반 에탄올 추출물로부터 항염증 활성 유효물질을 분리하기 위해 참모자반 에탄올 추출물을 용매간의 극성차를 이용하여 Hex, CHCl₃, EtAOc, BuOH 및 H₂O로 액/액 분배하여 순차적으로 용매별 분획을 얻었다. 분획물의 수율은 에탄올 추출물에 대하여 환산하였을 때, H₂O 분획물이 46.5%의 값을 보여 가장 높은 수율을 나타냈으며, Hex(41.3%), EtAOc(2.6%), CHCl₃(2.3%), BuOH(2.3%) 순으로 높은 수율을 보였다. 각 분획물의 항염증 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성 시킨 후, 각 분획물을 50 및 100 µg/mL 농도로 첨가하고 IL-6 및 TNF-α의 분비에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, IL-6의 경우(Fig. 14A), LPS 단독 처리 시 360.98±4.87 pg/mL의 분비량을 보였으나, Hex 분획물 및 CHCl₃ 분획물을 100 µg/mL로 처리 시 각각 63.29±6.82, 60.54±8.78 pg/mL으로 80% 이상의 IL-6 분비 억제 효과를 보였으며, TNF-α의 경우(Fig. 14B), LPS 단독 처리 시 2024.86±67.60 pg/mL의 분비량을 보였으나, Hex 및 CHCl₃ 분획물을 100 µg/mL로 처리 시 105.14±9.67, 205.03±13.52 pg/mL의 분비량을 보여 각각 89%, 94%의 TNF-α 분비 억제 효과를 가짐을 확인하였다. Choi 등(2013a)은 오미자의 Hex, CHCl₃, MeOH의 계통 분획 중 Hex 추출물의 항염증 활성이 가장 높아 Hex 추출물을 대상으로 silica gel column chromatography를 진행하였으며, Yoon 등(2007)은 큰비쭉 추출물을 이용한 순차분획에서 Hex 및 EtAOc, 분획물이 NO, iNOS 및

COX-2 발현 억제에 높은 효과를 보였다고 보고하였다. *n*-hexane은 가장 대표적인 비극성 용매로, 일반적으로 *n*-hexane에는 phenolic compound와 flavonoids, lipid 성분이 풍부하게 추출되는 것으로 알려져 있으며(Sultana et al., 2012), 본 연구 결과에서 항염증 효과 물질이 Hex 추출물에 많이 함유되어 있는 것으로 추정되었다. 참모자반 추출물의 성분 중 대부분이 지방산 관련 물질이라는 Kang 등(2008)의 보고로 미루어 볼 때, 참모자반의 항염증 활성 물질은 비극성 용매에 추출되는 lipid 성분으로 사료된다. 따라서 Hex 및 CHCl₃ 분획물 중 수율이 뛰어난 Hex 분획물을 이용하여 다음의 silica gel column chromatography를 진행하였다.



(A)



(B)

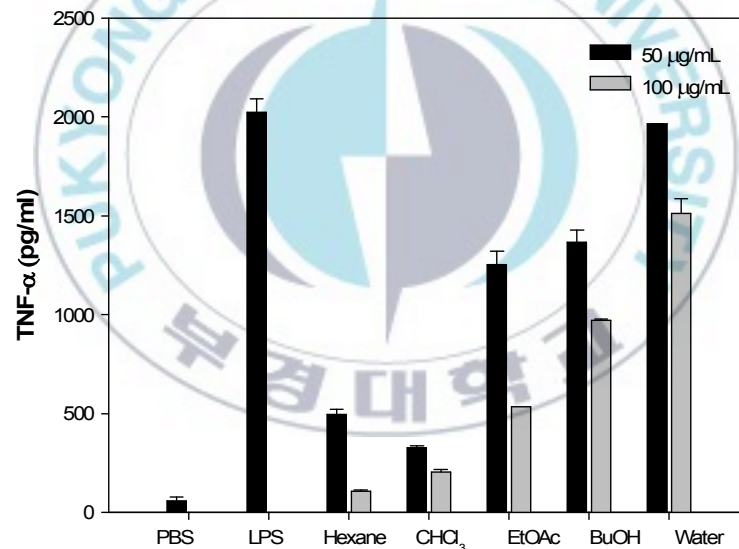
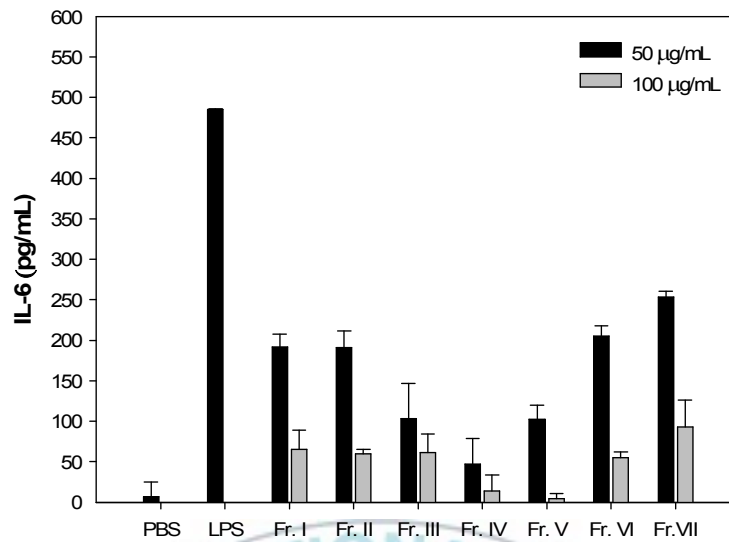


Fig. 14. Inhibitory effects of serial solvent fractions of *Sargassum fulvellum* ethanol extracts on the production of IL-6(A) and TNF- α (B) in RAW 264.7 cells.

2-2. Silica gel column chromatography에 의한 참모자반 n-hexane 추출물의 분획별 활성

가장 높은 항염증 활성을 보인 Hex 및 CHCl_3 분획물 중 수율이 가장 우수한 Hex 분획물을 CHCl_3 과 MeOH을 용매계로 하여 50:1, 20:1, 10:1, 5:1의 비율로 순차적으로 silica gel column chromatography를 실시하여 silica-TLC를 이용하여 총 7개의 분획물을 얻었다. 각 분획물의 항염증 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성 시킨 후, 각 분획물을 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가하고 IL-6 및 $\text{TNF-}\alpha$ 의 분비에 미치는 영향을 살펴보았다. 먼저 IL-6의 경우(Fig. 15A), LPS 단독 처리 시 485.01 ± 0.97 pg/mL의 분비량을 보였으나, 활성이 가장 좋은 4 및 5번 분획의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 14.37 ± 19.49 , 4.72 ± 5.85 pg/mL의 분비량을 보여 각각 99%, 97%의 분비 억제율을 보였다. $\text{TNF-}\alpha$ 의 경우(Fig. 15B), LPS 단독 처리 시 $2,637.43 \pm 31.86$ pg/mL의 분비량을 보였으나, 활성이 가장 높은 4번 분획물의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 41.50 ± 4.83 pg/mL으로 98% 이상의 분비 억제율을 보였다. 효과가 우수하였던 4번 및 5번 분획물 중 수율이 높은 4번 분획을 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

(A)



(B)

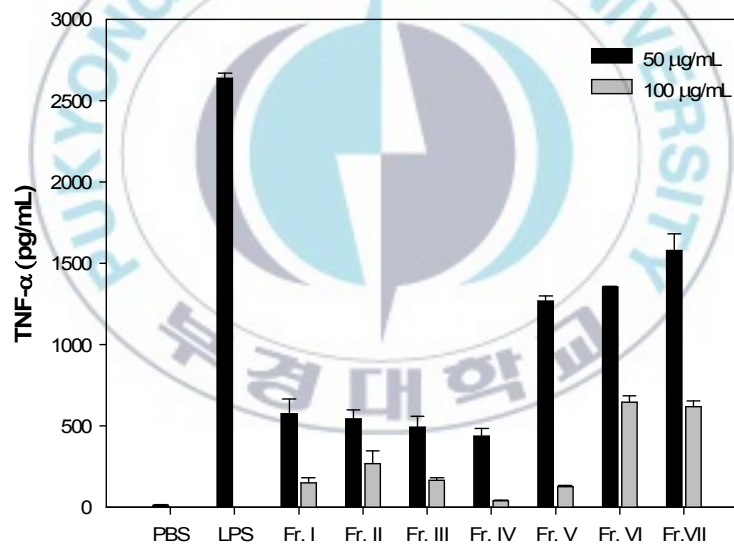
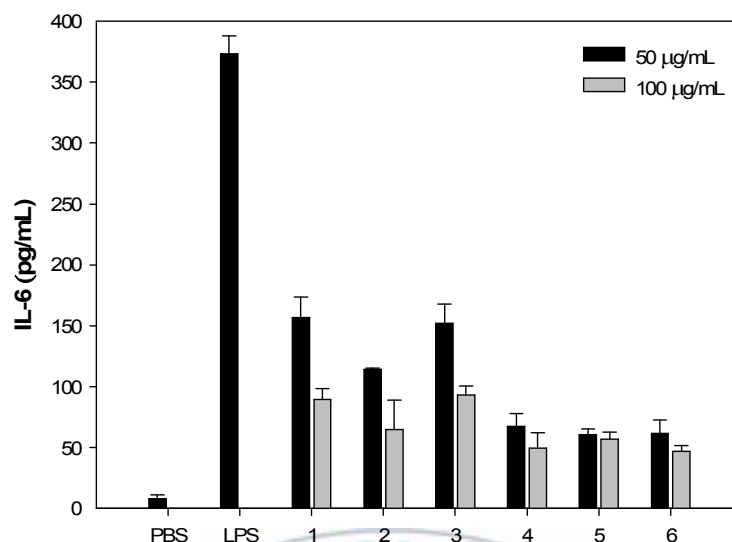


Fig. 15. Inhibitory effects of fractions of silica gel column chromatography (CHCl_3 : MeOH = 50:1~5:1) of hexane fraction of *Sargassum fulvellum* ethanol extracts on the production of IL-6(A) and TNF- α (B) in RAW 264.7 cells.

2-3. Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl_3 : MeOH = 1:1) 에 의한 분획별 활성

Silica gel column chromatography를 실시한 후 항염증 활성이 가장 뛰어났던 4번 분획을 이용하여 항염증 활성 유효 물질을 분리하기 위해 sephadex LH-20 column chromatography를 CHCl_3 과 MeOH을 1:1로 혼합한 용매를 이용하여 6개의 분획을 얻었다. 그 결과(Fig. 16), 4, 5, 6번 분획이 높은 활성을 보임을 확인하였다. IL-6 분비량에서(Fig. 16A), LPS 단독 처리 시 373.38 ± 14.62 pg/mL의 분비량을 보인 데 반해, 4, 5 및 6번 분획물을 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리 시 각각 49.51 ± 12.67 , 57.09 ± 5.85 , 46.75 ± 4.87 pg/mL으로 세 분획물 모두 84% 이상의 효과를 보였다. TNF- α 의 경우(Fig. 16B), LPS 단독 처리 시 $2,477.66 \pm 49.25$ pg/mL의 분비량을 보였으나, 4, 5 및 6 분획을 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시 각각 31.26 ± 23.17 , 21.7 ± 21.24 , 13.51 ± 0.00 pg/mL 으로 98% 이상의 효과를 보임을 확인하였다. 따라서 IL-6 및 TNF- α 분비 억제효과가 가장 우수한 4, 5 및 6번 분획물 중 가장 수율이 높은 5번 분획을 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

(A)



(B)

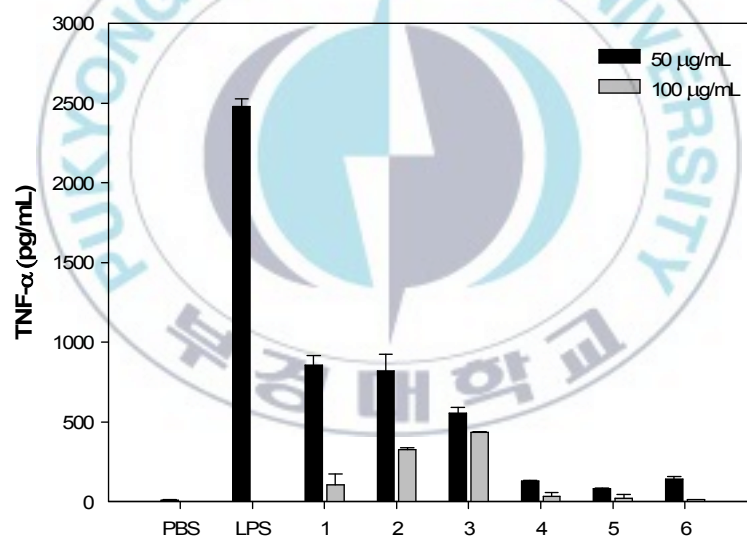


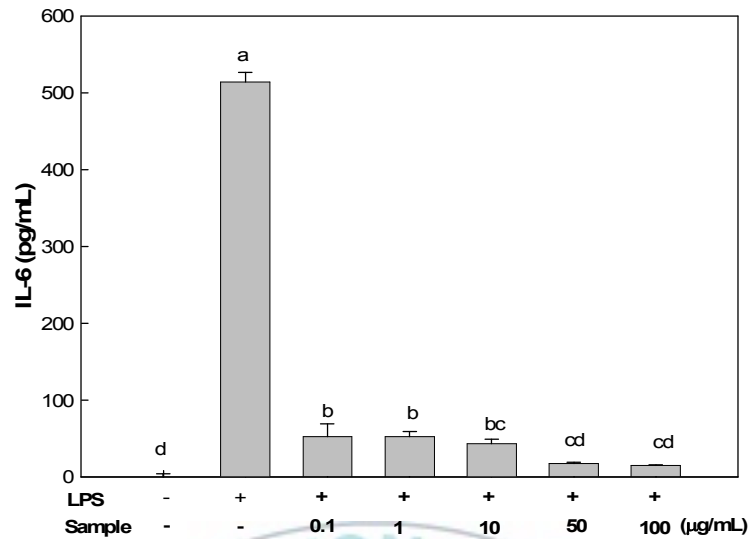
Fig. 16. Inhibitory effects of fractions from sephadex LH-20 column chromatography (CHCl_3 : MeOH = 1:1) of hexane fraction of *Sargassum fulvellum* ethanol extract on the production of IL-6(A) and TNF- α (B) in RAW 264.7 cells.

2-4. Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH) 에 의한 분획의 활성

정제도를 높이기 위하여 MeOH를 용매로 하여 2차 sephadex LH-20 column chromatography를 진행하였으며 TLC를 이용하여 분획물을 정제하였다. 얻은 분획을 이용하여 LPS 유도 RAW 264.7 세포에 대한 IL-6 및 TNF- α 분비 억제효과를 확인하였다. 그 결과(Fig. 17), 분획물의 첨가 농도 의존적으로 cytokine 분비량이 억제된 것을 확인하였으며, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리 시 IL-6 및 TNF- α 를 각각 71.15%, 98.07% 억제함을 확인하여 특히 TNF- α 의 분비 억제에 대한 효과가 높음을 확인하였다.



(A)



(B)

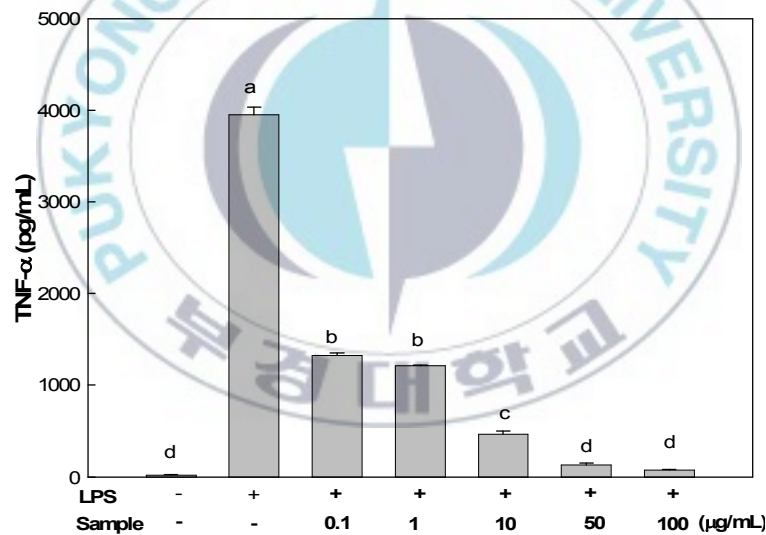


Fig. 17. Inhibitory effects of fractions from sephadex LH-20 column chromatography (MeOH) of hexane fraction of *Sargassum fulvellum* ethanol extract on the production of IL-6(A) and TNF-α (B) in RAW 264.7 cells. ^{a-d}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

2-5. HPLC 분석에 의한 정제

항염증 효과 물질의 분리 및 정제를 위해 2차 sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분리된 분획을 preparative HPLC(ODS column 10×150 mm, 25% MeOH, 3 mL/min) 분석을 진행하였다. 그 결과(Fig. 18), wavelength 254 nm에서 나타나는 retention time 12 min에 peak가 나타나 12 min 이전에 나타나는 작은 peak들을 합쳐 fraction 1, 12 min의 Peak를 fraction 2, 12 min 이후의 작은 peak들을 fraction 3으로 분리하였으며, fraction 1 및 3의 성분이 분자량이 낮은 지방산 성분임을 확인하였다. 분리된 fraction 2의 정제도 판단을 위하여 preparative HPLC를 진행하였으며, Fig. 19와 같이 본 물질이 순수 분리 단일물질임을 확인하였다. 이것을 CMB-2라고 명명하였다.

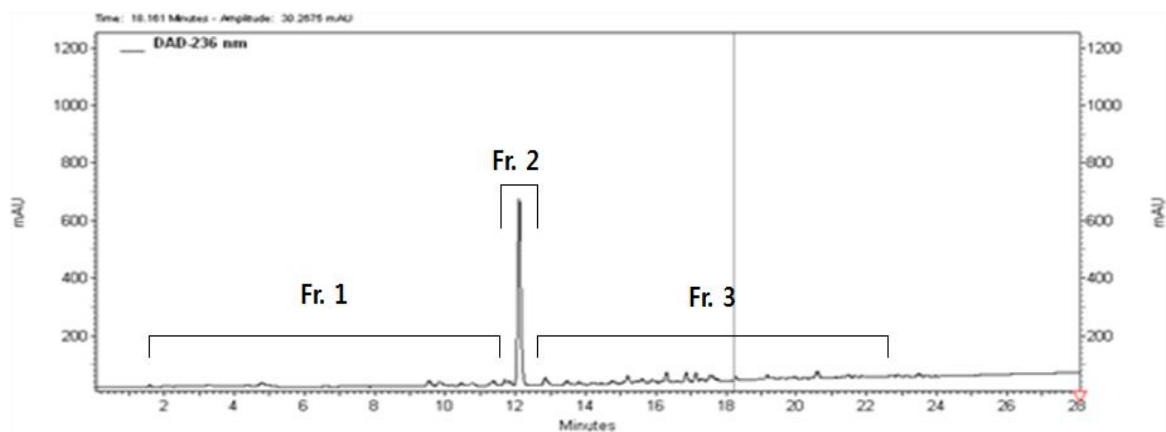


Fig. 18. HPLC chromatogram of a fraction of sephadex LH-20 column chromatography (MeOH).

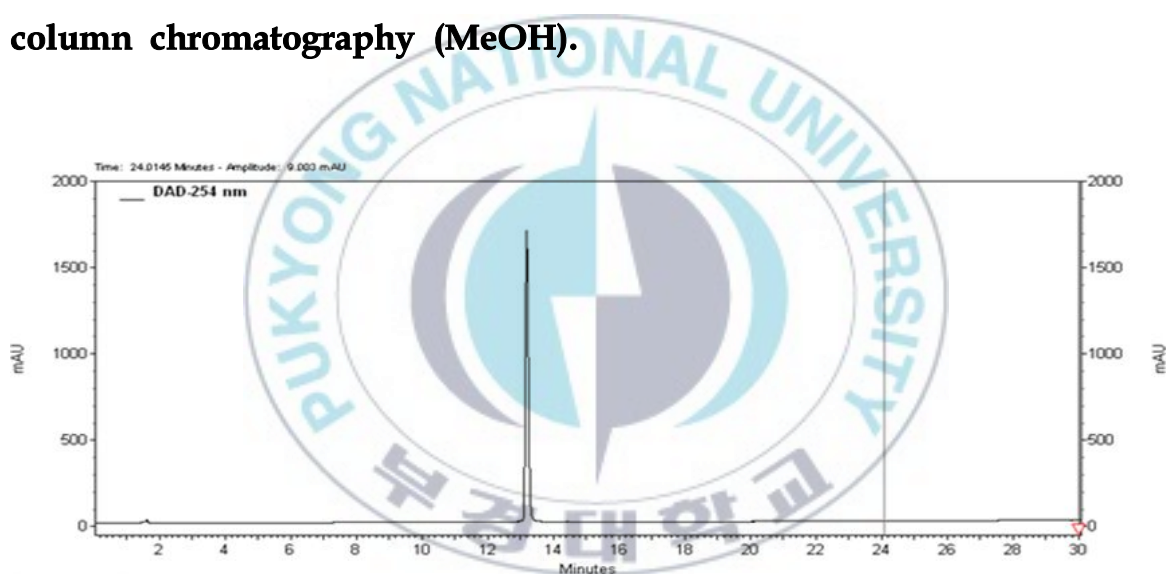


Fig. 19. HPLC chromatogram of fraction 2(CMB-2).

2-6. Grasshopper ketone의 분자 구조 및 분자량

2-6-1. NMR spectrum 분석

참모자반 에탄올 추출물로부터 정제된 활성물질인 CMB-2의 화학구조를 규명하기 위해 ^1H NMR, ^{13}C NMR Spectrum을 측정하였다. ^1H NMR Spectrum을 측정한 결과(Fig. 20), 5.82 (1H, s) ppm에서 한 개의 olefinic proton, 4.20 (1H, m) ppm에서 한 개의 oxygenated methine proton, 2.19/1.38, 1.92/1.33 ppm에서 두 개의 methylene proton, 2.18, 1.37 ($\times 2$), 1.14 ppm에서 네 개의 methyl proton이 관찰되었다. ^{13}C NMR Spectrum을 측정한 결과(Fig. 21), 총 13개의 피크가 관찰되었다. 즉 211.5 ppm에서 allene carbon, 200.8 ppm에서 carbonyl carbon, 119.9 ppm에서 sp^2 quaternary carbon, 101.1 ppm에서 sp^2 methine carbon, 72.4 ppm에서 sp^3 oxygenated quaternary carbon, 64.4 ppm에서 sp^3 oxygenated methine carbon, 49.9, 49.7 ppm에서 두 개의 methylene carbon, 37.0 ppm에서 sp^3 quaternary carbon, 32.3, 30.8, 29.3, 26.5 ppm에서 네 개의 methyl carbon이 관찰되었다.

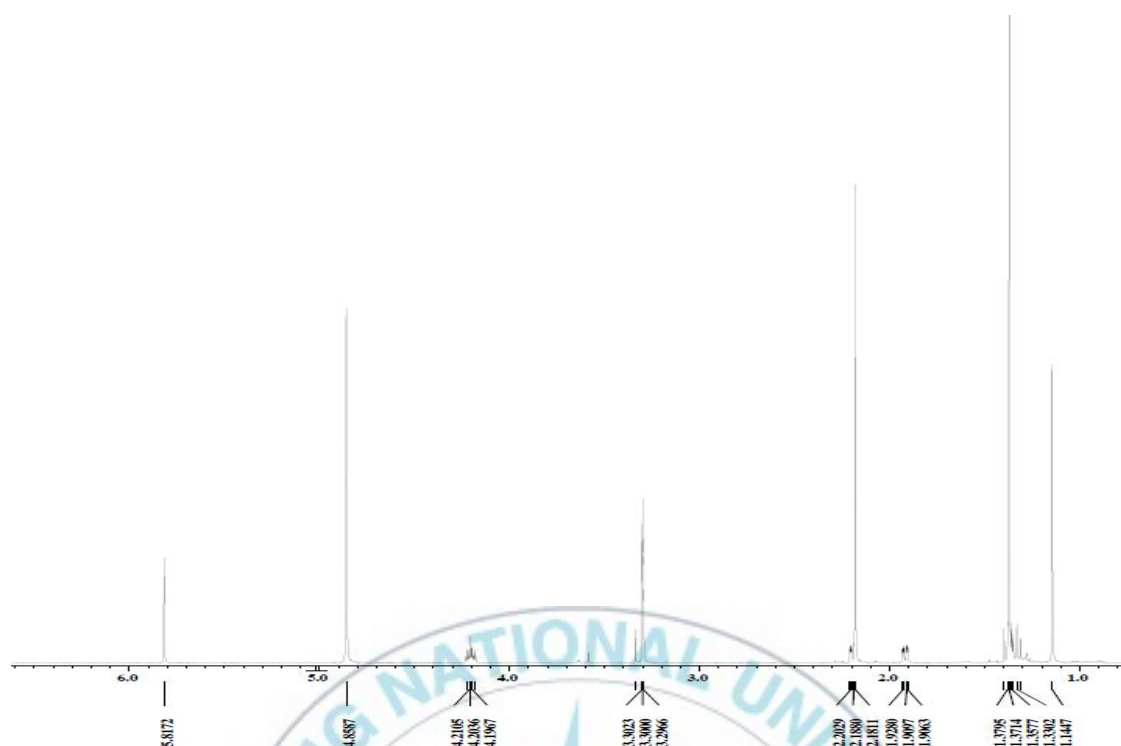


Fig. 20. ^1H -NMR spectra of the purified bioactive compounds (grasshopper ketone) from *Sargassum fulvellum* ethanol extract.

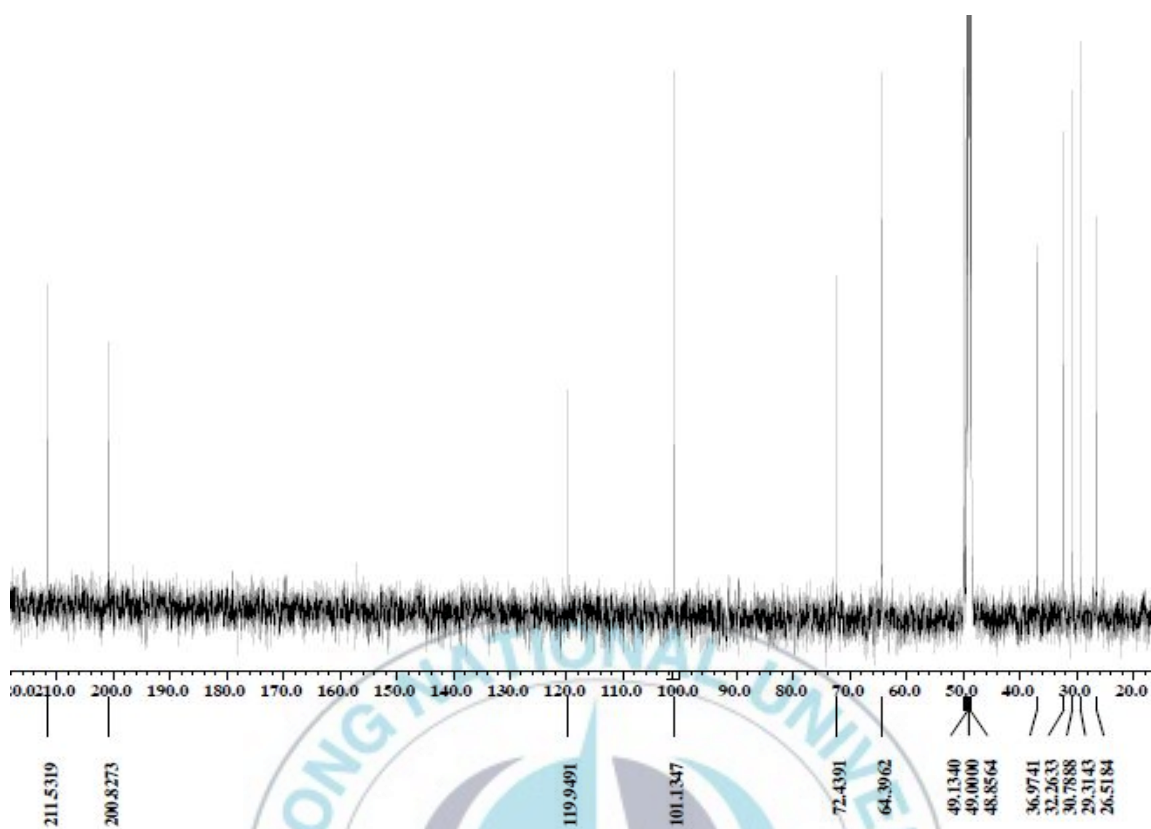
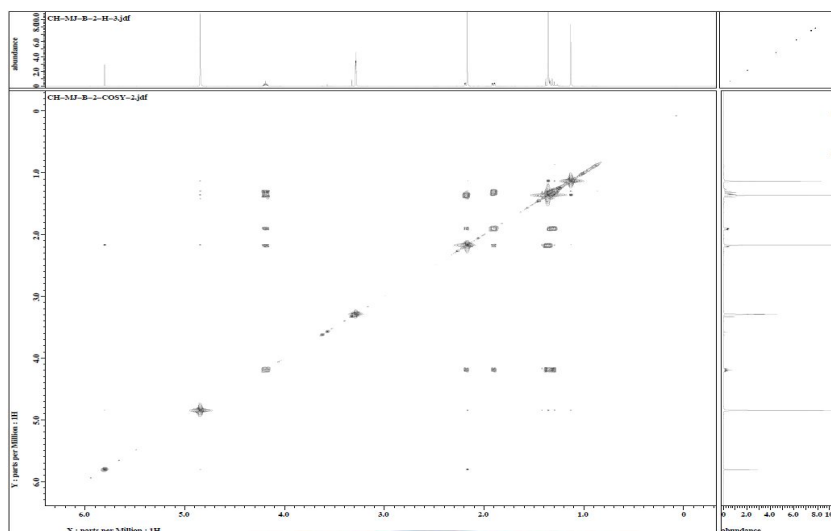


Fig. 21. ^{13}C -NMR spectra of the purified bioactive compound.

2-6-2. COSY, HMQC spectrum 및 HMBC spectrum 분석

Spectral assignment는 COSY, HMQC(Heteronuclear multiple quantum correlation), HMBC(Heteronuclear multiple bond correlation) spectrum 분석을 통해 확인하였다. ^1H - ^1H COSY spectrum 분석 결과(Fig. 22A), 1.92/1.33 ppm의 methylene proton과 4.20 ppm의 oxygenated methine proton 사이에서 cross-peak이 관찰되었고, 4.20 ppm의 Oxygenated methine proton과 2.19/1.38 ppm의 methylene proton 사이에서 cross-peak이 관찰되었다. 이에 따라 Fig. 22B와 같은 부분 구조를 확립하였다. HMQC(Heteronuclear multiple quantum correlation) Spectrum을 측정한 결과(Fig. 23A), 모든 proton-bearing carbon($^1J_{\text{C-H}}$)을 규명할 수 있었다. 또한 HMBC(Heteronuclear multiple bond correlation) spectrum을 측정한 결과(Fig. 23B), 5.82 ppm의 olefinic methine proton으로부터 211.5, 200.8, 119.9 ppm의 carbon에, 2.18 ppm의 methyl proton으로부터 200.8 ppm의 carbonyl carbon에 Long-range correlation이 관찰되었다. 또한 1.37 ppm의 Methyl proton으로부터 119.9, 72.4, 49.7 ppm의 carbon에, 1.14, 1.37 ppm의 methyl proton으로부터 119.9, 49.9, 37.0 ppm의 carbon에 long-range correlation이 관찰되었다. 이들 결과로부터 본 화합물은 grasshopper ketone (= icariside B1 aglycon)임을 확인하였다. 이는 Ren 등(2013)과 Otsuka 등(2003)이 보고한 Grasshopper ketone의 proton, carbon chemical shift와 정확히 일치함을 확인하였다. Fig. 22B에 화합물 grasshopper ketone의 화학구조 및 proton, carbon NMR peak의 귀속을 나타내었으며 참모자반 에탄올 추출물로부터 분리된 Grasshopper ketone의 최종 분자구조는 Fig. 24과 같다.

(A)



(B)

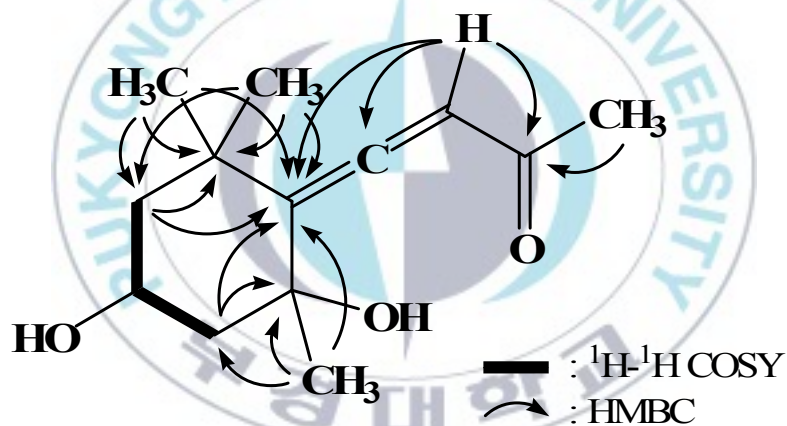
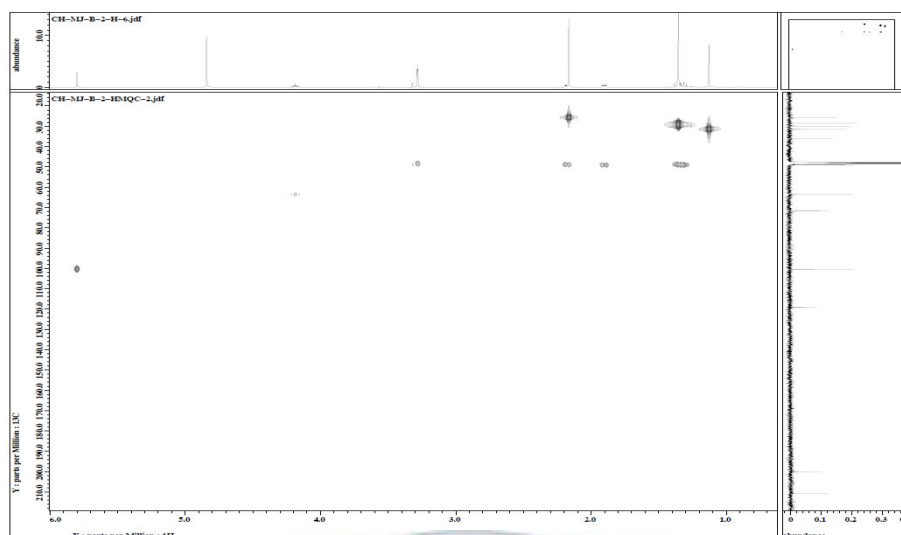


Fig. 22. COSY (correlation spectroscopy) spectra (A) and partial structure (B) of the purified bioactive compound (grasshopper ketone) from *Sargassum fulvellum* ethanol extract.

(A)



(B)



Fig. 23. HMQC (Heteronuclear multiple quantum correlation) (A) and HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation) (B) spectra of the purified bioactive compound (grasshopper ketone) from *Sargassum fulvellum* ethanol extract.

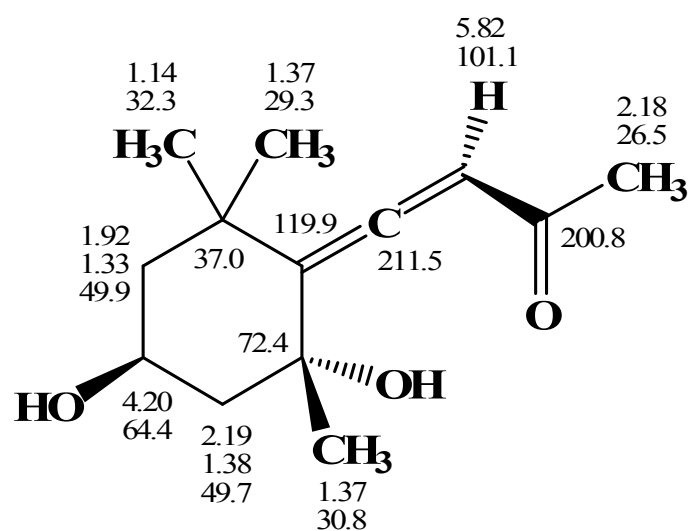


Fig. 24. Chemical structure of the purified bioactive compound (grasshopper ketone) from *Sargassum fulvellum* ethanol extract.



2-6-3. Mass spectrum 분석

NMR 분광 분석으로부터 얻은 화학구조의 확인을 위하여 mass 분석을 실시하였다. ESI-Mass spectrum을 측정한 결과(Fig. 25), m/z 225.0에서 $[M+H]^+$ peak가 관찰되어 분자량이 224($C_{13}H_{20}O_3$) Da임을 알 수 있었고, 이는 NMR 분광분석에 의하여 결정된 화학구조와 정확히 일치함을 확인하였다.



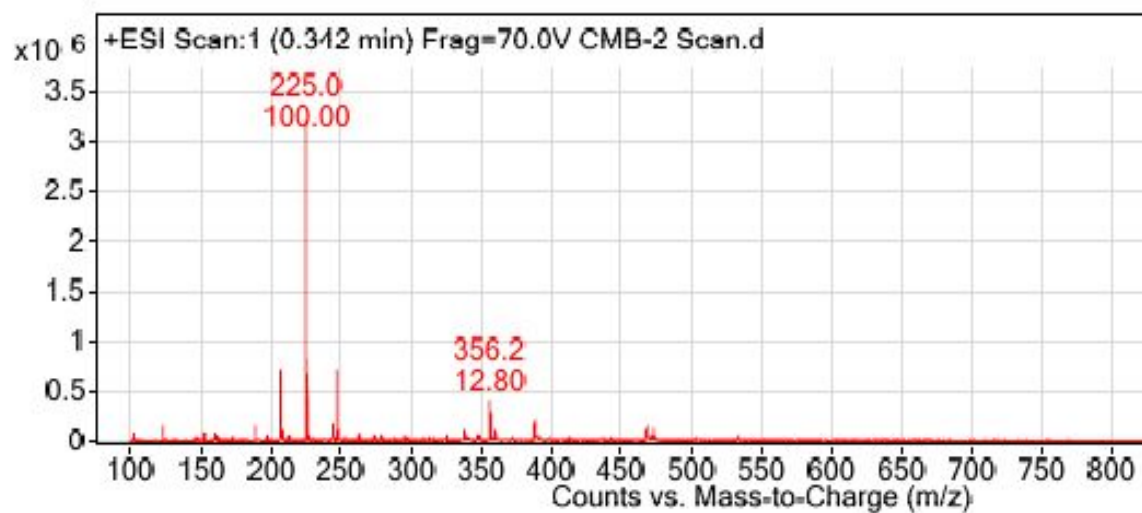


Fig. 25. ESI-mass spectrum of grasshopper ketone.



3. Grasshopper ketone의 항염증 활성

3-1. 세포 독성 측정

참모자반 에탄올 추출물로부터 분리한 grasshopper ketone의 대식세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. grasshopper ketone을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 배양한 결과(Fig. 26), 세포 증식 능에서 모든 첨가농도에서 negative control과 유의적인 차이를 보이지 않아 세포독성을 가지지 않는 것을 확인하였다.



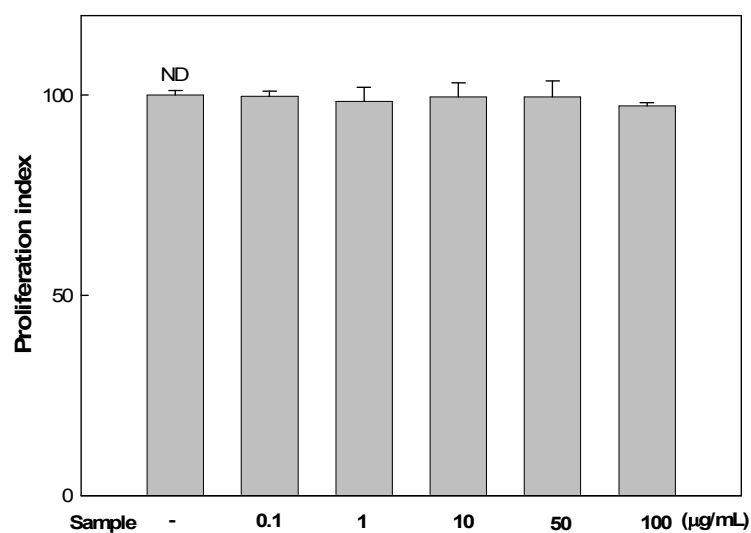
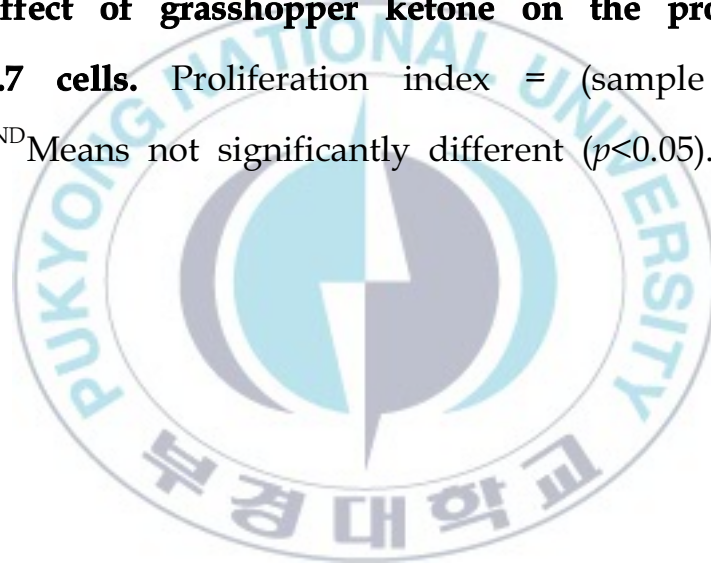


Fig. 26. Effect of grasshopper ketone on the proliferation of RAW 264.7 cells. Proliferation index = (sample O.D/control O.D)*100. NDMeans not significantly different ($p < 0.05$).



3-2. Nitric oxides 생성 억제 효과

참모자반 에탄올 추출물로부터 분리한 grasshopper ketone의 항염증 활성을 알아보기 위해 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포의 NO 분비 억제활성을 측정하였다. 그 결과(Fig. 27), LPS 처리를 하지 않은 대조구에서 $1.16 \pm 0.71 \mu\text{M}$ 으로 낮은 분비량을 보였으나, LPS 처리 시 $18.12 \pm 0.50 \mu\text{M}$ 으로 NO 분비가 급격하게 증가함을 확인하였으며, grasshopper ketone에 의해 첨가 농도 의존적으로 현저히 감소함을 확인하였다. 특히 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시 $0.96 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 의 NO 분비를 보여 control과 유의적인 차이가 없는 정도로 NO 분비를 억제함을 확인하였다. $100 \mu\text{g/mL}$ 의 grasshopper ketone은 약 $22.4 \mu\text{M}$ (M.W. 224)으로 나타낼 수 있으며, 이를 잔가시 모자반(*Sargassum micracanthum*)에서 분리한 sargachromenol을 $100 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 때 61.6%의 NO 억제효과를 보인 결과(Yang et al., 2013b)와 비교해볼 때, 참모자반에서 분리한 grasshopper ketone이 다른 갈조류로부터 분리한 항염증 효과물질에 비해 낮은 농도에서도 현저히 높은 항염증효과를 가짐을 확인하였다.

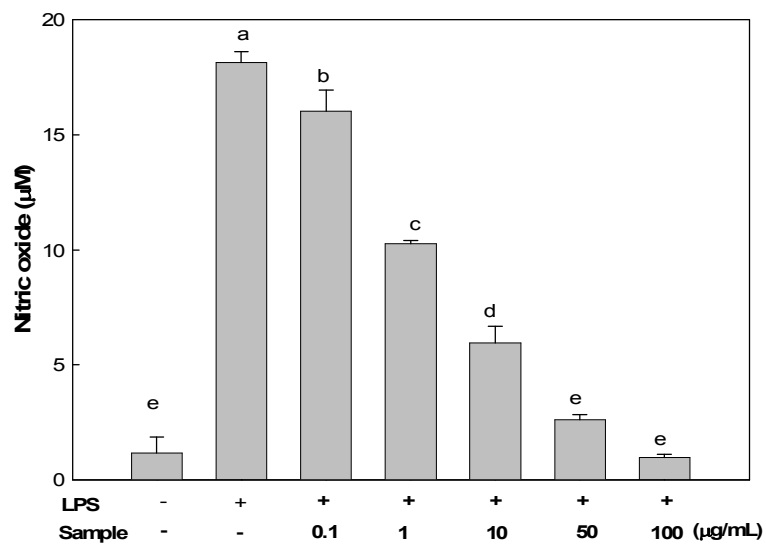


Fig. 27. Inhibitory effects of grasshopper ketone on production of nitric oxides in RAW 264.7 cells.

^{a-g}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

3-3. 염증 관련 **cytokines** 생성 억제 효과

본 연구에서 분리된 항염증 유효물질인 grasshopper ketone은 allen기를 함유하는 지용성색소인 carotenoid의 일종으로, 날지 못하는 메뚜기(*Romalea microptera*)에서 처음 분리 동정되었으며, 다른 allenic carotenoid를 섭취하였을 때 대사산물로 생성되는 물질로 알려져 있다 (Hoffman-Roder & Krause, 2004). 이러한 grasshopper ketone의 생리활성으로는 일본 쌀 종류 중 하나인 Awaakamai에서 이 작물의 타감효과를 나타내며(Kato-Noguchi et al., 2012), 잠분 메탄올 추출물에서 분리되어 아토피 치료효과를 가지는 것으로 보고된 바 있다(Park, 2010). 이외에도 연잎(Ahn, 2013), *Aglaia silvestris*의 열매 및 가지(Hwang et al., 2004), 명아주(*Chenopodium album*)(DellaGreca et al., 2004), 삼지닥나무(*Edgeworthia chrysantha*)(Hashimoto et al., 1991)에 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며 참모자반과 같은 갈조류에서는 처음 분리 되었다.

참모자반에서 분리된 grasshopper ketone의 항염증 효과에 대해 알아보기 위해 염증반응의 주요 매개체로 작용하는 cytokine의 분비에 대한 억제효과를 살펴보았다. IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 분비량을 측정한 결과(Fig. 28-30), grasshopper ketone의 처리 농도 의존적으로 각각의 cytokine의 분비가 유의적으로 억제됨을 확인하였다. 특히 IL-6의 경우 50 $\mu\text{g/mL}$ (11.2 μM)의 농도에서 약 90%의 억제효과를 보였으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 시 negative control과 유의적인 차이를 보이지 않음을 확인하였다. 또한 TNF- α 와 IL-1 β 의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ (22.4 μM)의 농도로 처리 시 각각 약 97%, 78%의 억제 효과를 보임을 확인

하였다.

참모자반과 마찬가지로 갈조류의 일종인 파배기 모자반(*Sargassum siliquastrum*)으로부터 분리한 fucoxanthin 유도체의 경우, 60 μ M로 처리 시 IL-6 및 TNF- α 의 분비를 각각 37.9%, 42.06% 억제한 결과(Heo et al., 2012)로 미루어 보아, grasshopper ketone이 매우 우수한 항염증 효과가 있음을 확인하였다.



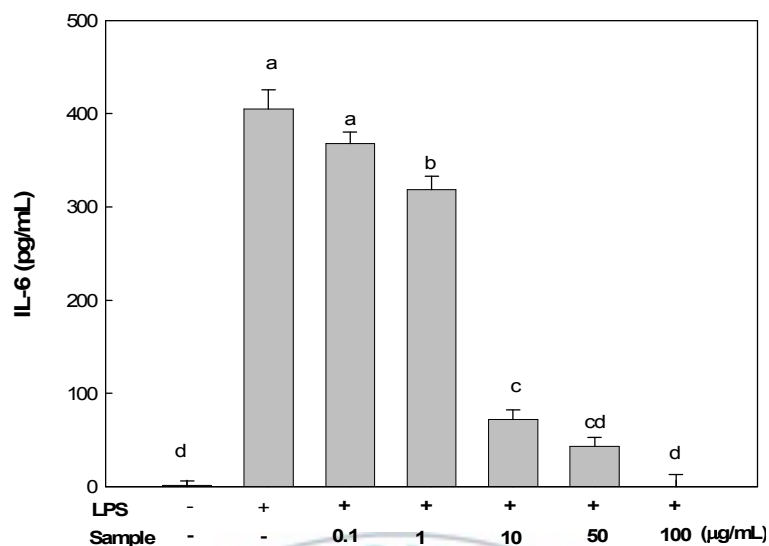


Fig. 28. Inhibitory effects of grasshopper ketone on production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

^{a-d}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

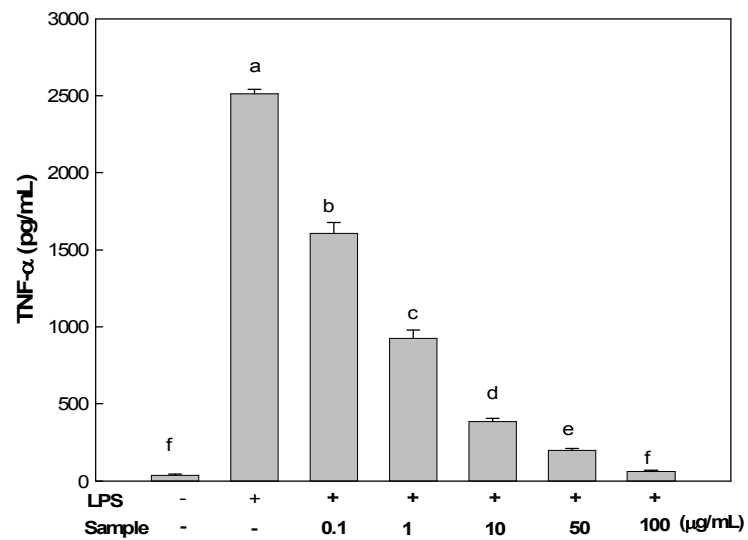


Fig. 29. Inhibitory effects of grasshopper ketone on production of TNF- α in RAW 264.7 cells.

^{a-f}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

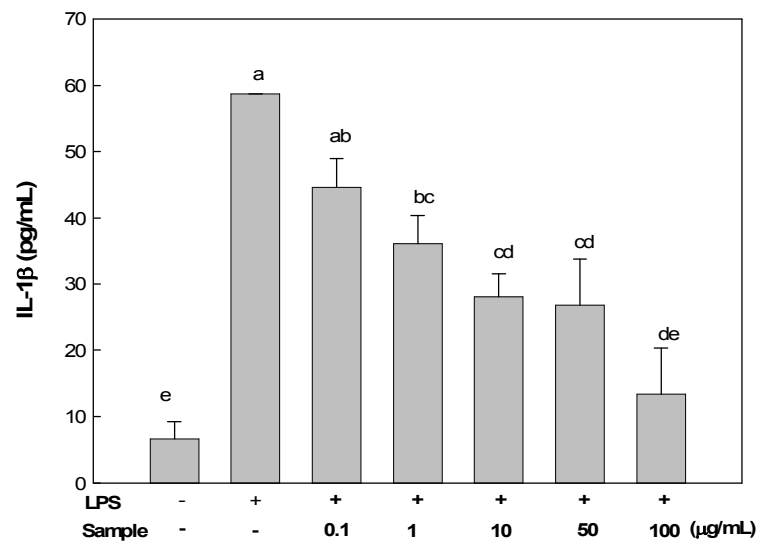


Fig. 30. Inhibitory effects of grasshopper ketone on production of IL-1 β in RAW 264.7 cells.

^{a-e}Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

3-4. iNOS, COX-2 및 NF- κ B 억제 효과

참모자반 에탄올 추출물에서 분리한 grasshopper ketone이 어떤 기작을 통해 항염증 효과를 나타내는지를 알아보기 위하여 iNOS, COX-2 및 NF- κ B에 대한 억제효과를 살펴보았다. 그 결과, RAW 264.7 cell 세포질 내의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 100 μ g/mL의 농도로 처리 시 control구에 비해 각각 60% 및 58%의 억제 효과를 보임을 확인하였다(Fig. 31A, B). 또한 RAW 264.7 cell의 핵 내 NF- κ B/p65의 단백질 발현을 살펴본 결과 100 μ g/mL의 농도로 처리 시 약 69%의 억제 효과를 보임을 확인하였다(Fig. 30C). 유사한 결과로 Yang 등 (2013a)은 *S. muticum*에서 분리한 apo-9'-fucoxanthinone이 NF- κ B 활성화를 억제함으로써 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 억제하여 항염증 효과를 가진다고 보고하였다. 본 결과를 통해 GK가 염증 기작 중 TLR/MyD88 경로를 통한 NF- κ B 활성화 기작을 억제함으로써 염증성 cytokine 및 iNOS, COX-2의 발현을 감소시켜 항염증 효과를 가지는 것을 확인하였다.

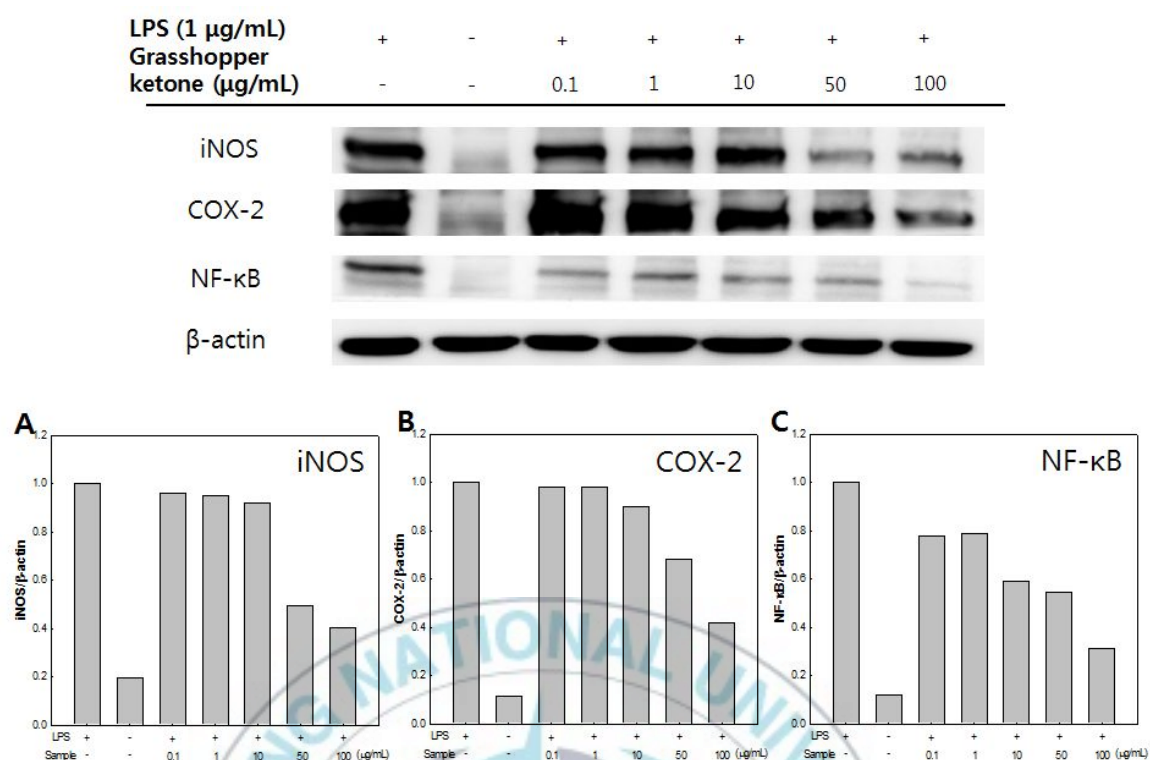


Fig. 31. Inhibitory effects of grasshopper ketone on the protein expression of iNOS (A), COX-2 (B), and NF- κB (C) in RAW 264.7 cells. The levels of iNOS and COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF- κB in nuclear protein were determined by a western blot analysis.

3-5. MAPKs 억제 효과

MAPKs의 인산화에 미치는 효과를 알아보기 위하여, LPS로 유도한 RAW 264.7 cell의 염증 반응에서 p-p38, p-ERK 및 p-JNK 단백질의 발현을 western blot을 통해 알아보았다. 그 결과(Fig. 32A-C), 각각의 단백질을 LPS만 처리한 control구에 비하여 50%, 60%, 46%의 억제효과를 가짐을 확인하였다. 본 연구와 동일한 결과로, Heo 등(2014)은 *Sargassum* sp.의 일종인 *S. siliquastrum*에서 분리한 sargachromanol D가 LPS 유도 염증 반응에서 NF- κ B와 JNK, ERK의 인산화를 억제함으로써 항염 효과를 가진다고 보고하였으며, 또한 Lee 등(2013)은 *S. siliquastrum*에서 분리한 sargachromanol E가 ERK 및 JNK의 phosphorylation을 현저히 억제하였으나, p38에 대해서는 큰 효과를 보이지 않는다고 보고하였다. 따라서 *S. fulvellum*로부터 분리된 grasshopper ketone은 Fig. 33에 나타낸 바와 같이 NF- κ B 및 MAPKs 의존 전사 경로를 억제하여 우수한 항염증 효과를 가짐을 확인하였다.

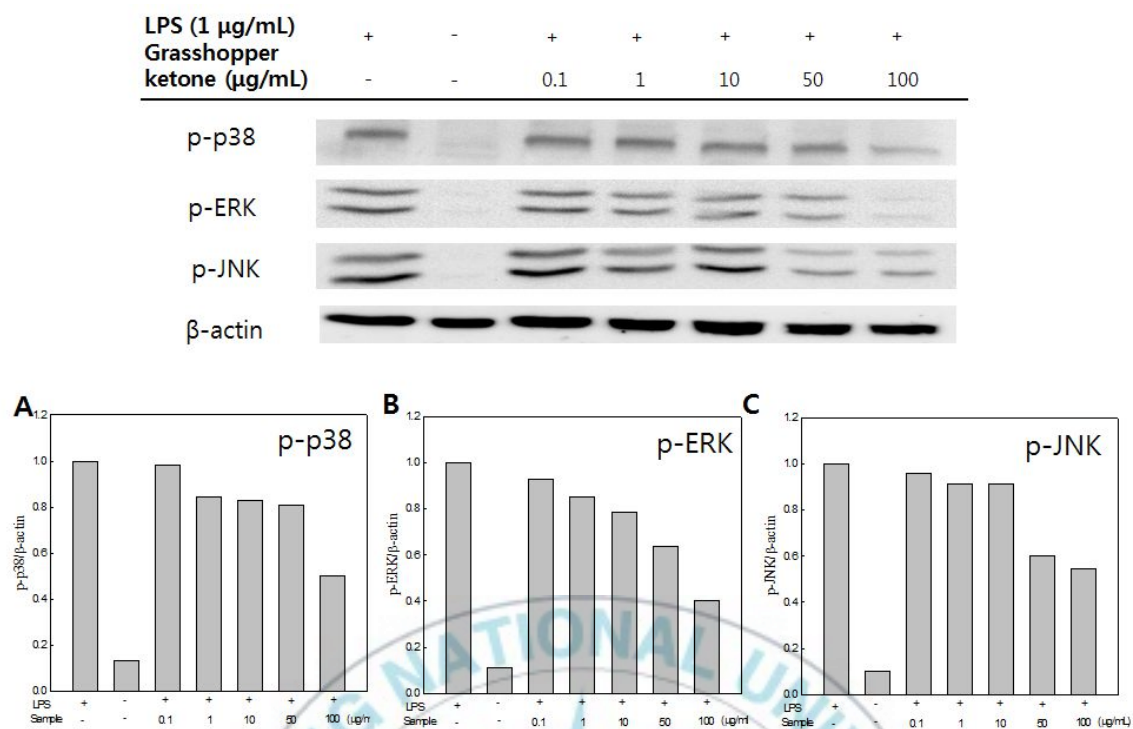


Fig. 32. Inhibitory effects of grasshopper ketone on the of MAPKs in LPS-induced RAW 264.7 cells. The levels of phospho-p38 (p-p38) (A), p-ERK (B), and p-JNK (C) were determined by a western blot analysis.

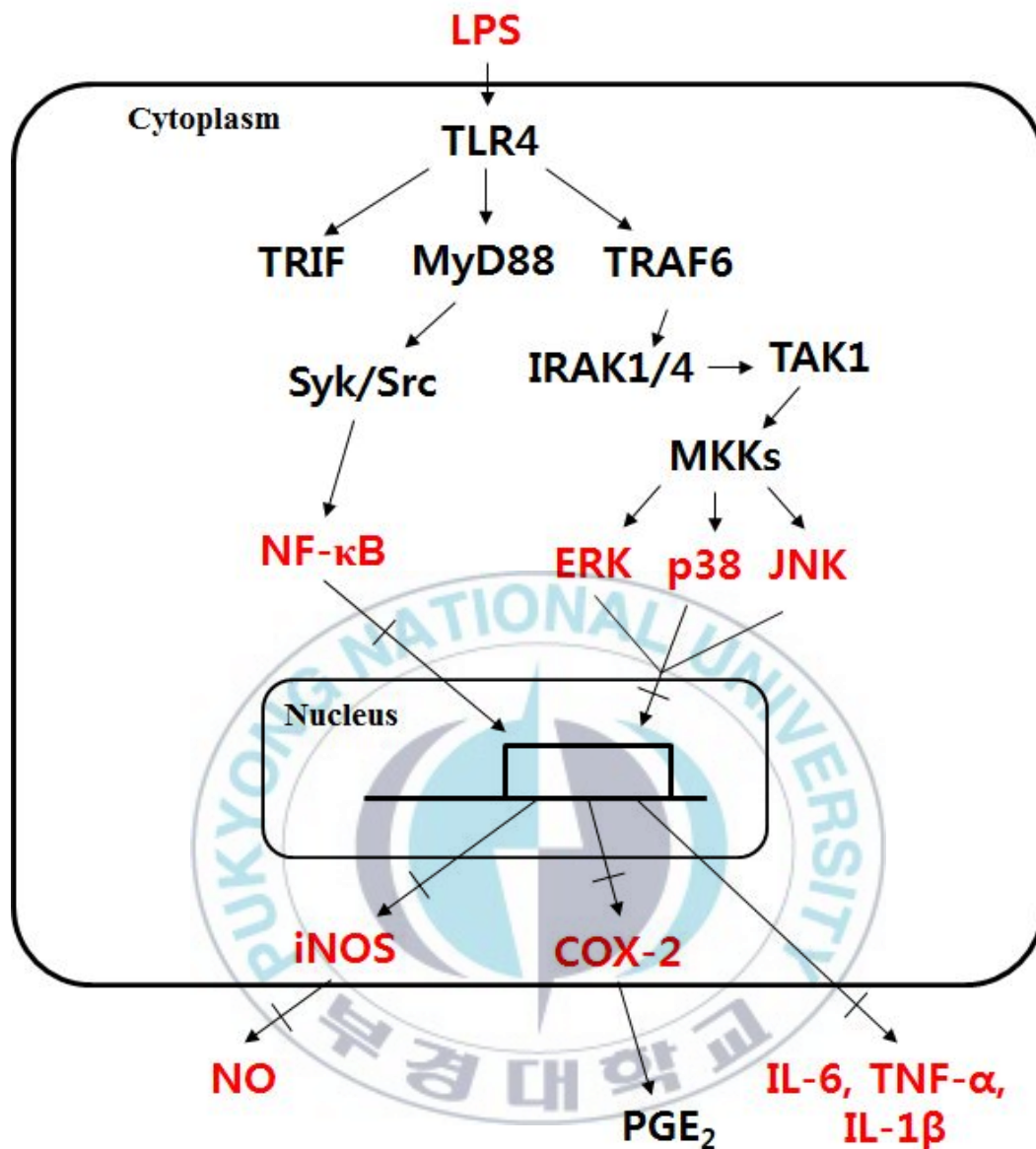


Fig. 33. Schematic diagram of a potential inhibitory pathway used by *Sargassum fulvellum* ethanol extract, tuna heart ethanol extract, and grasshopper ketone during the LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells.

요 약

본 연구에서는 LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 cell line과 mouse 염증모델을 이용하여 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 항염증 활성을 알아보고, 그 효과적인 이용을 위해 참모자반의 항염증 효과물질을 분리 정제하였다.

1. 참모자반 및 참치심장 추출물의 항염증 활성

1-1. 세포 독성

참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가하여 배양한 결과, 모든 첨가농도에서 RAW 264.7 세포의 증식능이 negative control과 유의적인 차이가 없어 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

1-2. Nitric oxide 생성량

LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 세포에 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 첨가하여 배양한 결과, 모든 첨가농도에서 농도 의존적으로 NO 분비량이 현저히 감소함을 확인하였다.

1-3. Pro-inflammatory cytokine 분비량

참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 처리한 경우, 모든 농도의 처리구에서 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 분비가 농도 의존적으로 감소함을 확

인하였으며, 두 시료 모두 100 µg/mL의 농도로 처리 시 모든 cytokine에 대해 70% 이상의 억제효과를 보였다.

1-4. iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현량

참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 처리한 경우, 모든 첨가 농도에서 농도 의존적인 단백질 발현 억제 효과를 확인하였다. 특히 참모자반의 경우, 100 µg/mL로 처리 시 iNOS 발현을 control구에 비해 약 87% 억제하여 우수한 효과를 확인하였다. 또한 참치심장의 경우, 100 µg/mL로 처리 시 COX-2 및 NF-κB 단백질 발현을 50%이상 억제한 것을 확인하였다. 이를 통해 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물이 NF-κB 발현을 억제함으로써 iNOS와 COX-2 발현을 억제하여 항염증 효과를 가짐을 확인하였다.

1-5. MAP Kinases 발현량

참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 처리한 경우, 모든 첨가 농도에서 농도 의존적인 MAPKs 단백질 발현 억제 효과를 확인하였다. 특히 참모자반 에탄올 추출물의 경우, 100 µg/mL로 처리 시 JNK, ERK 및 p38의 세가지 kinase의 인산화를 50% 이상 억제하여 매우 우수한 효과를 보였다.

1-6. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물을 경구 투여한 후 귀 부종을 유발하여 귀 부종에 대한 억제효과를 살펴본 결과, croton oil 처리군과

비교 시 유의적으로 귀 부종이 억제됨을 확인하였으며, 두 시료 모두 250 mg/kg 처리 시 prednisolon 50 mg/kg 처리구와 유사한 정도의 부종 억제효과가 있음을 확인하였다. 또한 조직관찰에서도 경피 및 진피 두께를 효과적으로 억제하고, 염증부위의 mast cell 침윤이 억제됨을 확인하였다.

1-7. 단기 독성 평가

참모자반 및 참치심장 에탄올 추출물의 경구독성을 알아보기 위해, 마우스를 이용하여 2주간 단기 독성평가를 실시하였다. 그 결과, 두 시료 모두 치사율이 0%로 나타나 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

2. 참모자반으로부터 항염증 활성 물질의 분리 정제 및 구조 동정

2-1. 계통 분획

Hex, CHCl_3 , EtAOc, BuOH, H_2O 를 용매계로 하여 계통 분획을 얻어 각각의 항염증활성을 측정한 결과, Hex 분획이 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 IL-6 및 TNF- α 에 대해 80% 이상의 분비 억제효과를 보였다.

2-2. Silica gel column chromatography

높은 항염증 활성을 보인 Hex 분획을 이용하여 silica gel column chromatography (CHCl_3 : MeOH = 50:1, 20:1, 10:1, 5:1)를 실시하였으며, 4번 분획이 우수한 효과를 보였다.

2-3. Sephadex LH-20 column chromatography

우수한 항염증 효과를 보인 silica gel column chromatography의 4번 분획을 이용하여 sephadex LH-20 column chromatography (CHCl_3 : MeOH = 1:1)를 실시하여 IL-6 및 TNF- α 억제효과를 측정하였으며, 높은 효과를 보인 5번 분획을 이용하여 sephadex LH-20 column chromatography(MeOH)를 1회 더 실시하여 정제된 분획을 얻어 항염증 효과를 측정하였으며, 특히 TNF- α 에 대해 98% 이상의 매우 우수한 항염증효과를 가짐을 확인하였다.

2-4. HPLC

항염증 효과 물질의 분리 정제를 위해 HPLC analysis를 진행하였으며, retention time 12min의 peak (fraction 2)를 분리하여 순수 분리 정제된 단일 물질 CMB-2를 획득하였다.

2-5. NMR 및 ESI-MS

분리 정제된 항염증효과 물질의 구조분석을 위해 NMR 및 ESI-MS를 실시하였으며, grasshopper ketone임을 확인하였다.

3. 참모자반으로부터 분리한 Grasshopper ketone의 항염증 활성

3-1. 세포 독성

Grasshopper ketone을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리 시 RAW 264.7 세포의 세포 증식 능에 영향을 주지 않는 것을 확인하여 세포독성을 가지지 않음을 확인하였다.

3-2. Nitric oxide 생성량

Grasshopper ketone 첨가농도가 증가함에 따라 NO분비량이 유의적으로 감소함을 확인하였으며, 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가 시 90% 이상의 NO억제효과를 보여 우수한 항염증효과를 확인하였다.

3-3. Pro-inflammatory cytokine 분비량

LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 세포의 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 분비를 효과적으로 억제하여 항염증효과가 있음을 확인하였다.

3-4. iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량

Grasshopper ketone이 염증 반응의 signal에 미치는 영향을 살펴보기 위해 전사인자인 NF- κ B 및 염증성 효소인 iNOS, COX-2에 대한 효과를 살펴본 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 처리 시 각각에 대하여 control 대비 69%, 60%, 58%의 억제 효과를 가짐을 확인하였다.

3-5. MAP Kinases 발현량

NF- κ B 의존 경로 이외에 MAPKs signal에 대한 억제 효과를 살펴본 결과, p38, ERK 및 JNK의 인산화를 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 처리 시, control에 비하여 각각 50%, 60%, 46%의 우수한 억제 효과를 보임을 확인하였다.

위의 결과에 따라 본 연구에서는 참모자반 및 참치심장 에탄올 추출

물이 LPS로 유도한 *in vitro* type 염증 반응모델에서 NF- κ B 및 MAP kinase 활성화 경로를 억제하여, iNOS 및 COX-2의 발현과 NO 및 pro-inflammatory cytokine의 생성을 억제함으로써 항염증효과를 가지는 것을 확인하였으며, 염증유도 동물모델에서도 귀 부종 억제효과를 확인하여 *in vivo* type의 실험에서도 우수한 효과를 가짐을 입증하였다. 특히 참치 심장 에탄올 추출물의 항염증 효과는 단백질 유래 peptide의 효과인 것으로 사료되며, 이러한 관점에서 참치 심장 에탄올 추출물 내에 함유된 항염증 활성 peptide 성분 분석에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

또한 참모자반 에탄올 추출물로부터 항염증효과 물질인 grasshopper ketone을 정제하였으며 분리된 grasshopper ketone이 세포독성을 가지지 않으면서 염증 매개 인자들을 효과적으로 억제하여 우수한 항염증 효과를 가짐을 확인하였다.

참고 문헌

- Ahn, C. B., Cho, Y. S., Je, Y. J. 2015. Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. Food Chem 168, 151-156.
- Ahn, J. H. 2013. Chemical constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* and their pancreatic lipase inhibitory activity. MS Thesis, Chungbuk university.
- Bae, S. J. 2004. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fraction on several human cancer cell lines in vitro. J Korean Soc Food Sci Nutr 33, 480-486.
- Baeuerle, P. A., Henkel, T. 1994. Function and activation of NF κ B in the immune system. Annu Rev Immunol 12, 141 - 179.
- Beutler, B., Cerami, A. 1989. The biology of cachectin/TNF- α a primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol 7, 25-655.
- Bishop-Bailey, D., Calatayud, S., Warner, T. D., Hla, T., Mitchell, J. A. 2002. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. J Environ Pathol Tox Oncol 21, 93-101.
- Camacho-Barquero, L., Villegas, I., Sanchez-Calvo, J. M., Talero, E., Sanchez-Fidalgo S., Motilva, V., Lastra, C. A. 2007. Curcumin, a

Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. Int Immunopharmacol 7, 333-342.

Castillo, L., DeRojas-Walker, T., Yu, Y. M., Sanchez, M., Chapman, T. E., Shannon, D., Tannenbaum, S., Burke, J. F., Young, V. R. 1995. Whole body arginine metabolism and nitric oxide synthesis in newborns with persistent pulmonary hypertension. Pediatr Res. 38, 17 - 24.

Chae, S. Y., Kim, M. J., Kim, D. S., Park, J. E., Jo, S. K., Yee, S. T. 2007. Effect of *Asterina pectinifera* extraction on the activation of immune cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 36: 269-375.

Chang, D. K., Lee, K. L, Kim, J. G. 1994. Follow-up of ulcerative colitis: short-term outcome to medical treatment and relapse rates. Korean J Gastroenterol 26, 907-918.

Cheong, H. S. 2007. Antioxidant effect of histidine containing low molecular weight peptide isolated from *Skipjack* boiled extract. Korean J Food Cook Sci 23, 221-226.

Cho, S. M., Gu, Y. S., Kim, S. B. 2005. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids 19, 221-229.

Choi, H. J., Choi, Y. W., Baek, S. Y., Kim, B. S., Ahn, S. C., Rhee, M. S., Yoon, S. 2013a. Activity-guided screening of anti-inflammatory compounds from the hexane extracts of *Schisandra chinensis* fruit. J of Life Science 23, 311-318.

Choi, I. W., Kim, S. U., Seo, D. C., King, B. H., Sohn, B. K., Rim, Y. S., Heo, J. S., Cho, J. S. 2005. Biosorption of heavy metals biomass of seaweeds, *Laminaria* species, *Ecklonia stolonifera*, *Gelidium amansii*, and *Undaria pinnatifida*. Korean J Environ Agri 24, 370-378.

Choi, S. B., Bae, G. S., Jo, I. J., Park, K. C., Seo, S. H., Kim, D. G., Shin, J. Y., Gwak, T. S., Lee, J. H., Lee, G. S., Park, S. J., Song, H. J. 2013b. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum erythrorhizon* on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. Kor J Herbology 28, 67-73.

Choi, W. S., Shin, P. G., Yoo, Y. B., Noh, H. J., Kim, G. D. 2013c. Anti-inflammatory effects of *Sparassis crispa* extract. J Mushroom Sci Prod 11, 46-51.

D'Acquisto, F., Iuvone, T., Rombolà, L., Sautebin, L., Di Rosa M and Carnuccio R. 1997. Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. FEBS Lett 418, 175-178.

Delgado, A. V., McManus, A. T., Chambers, J. P. 2003. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2 and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuro* 37, 355-361.

DellaGreca, M., Marino, C. D., Zarrelli, A., D'Abrosca, B. 2004. Isolation and phytotoxicity of apocarotenoids from *Chenopodium album*. *J Nat Prod* 64, 1492-1495.

Djeu, J. Y., Blanchard, D. L., Richards, A. L., Fridman, H. 1988. Tumor necrosis factor induction by candida albicans from human natural killer cells and monocytes. *J Immunol* 141, 4047-4052.

Dogne, M., Hanson, K., Supuran, C., Pratico, D. 2006. Coxibs and cardiovascular side-effects: from light to shadow. *Curr Pharm Des* 12, 917-975

Dong, C., Davis, R. J., Flavell, R. A. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20, 55-72.

Donguibogam Committee. 1999. Translated donguibogam. Bubinmunwha Press, Seoul, p. 2198.

Duerksen-Hughes, P. J., Day, D., Laster, S. M. A., Zacharidase, N. A., Aquino, L., Gooding, L. R. 1992. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J Immunol* 149, 2-14.

Erdmann, K., Cheung, B. W., and Schröder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* 19, 643-654.

Ghosh, S., Hayden, H.S. 2008. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8, 837-848.

Giovannucci, E. 1999. Tomatoes, tomato-base products, lycopene, and cancer. *J National Cancer Institute* 91, 317-331.

Giuliani, C., Napolitano, G., Bucci, I., Montani, V., Monaco, F. 2001. NF- κ B transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications. *Clin Ter* 152, 249-253.

Gray, J. I and Dugan, Jr L. R. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J Food Sci* 40, 981-984.

Hahm, D. H., Sur, B. J., Han, D. O., Park, J. H., Jung, E. T., Lee, H. J., Koh, Y. J., Choi, H. D. 2008. Anti-inflammatory activity of dandelion in mice. *Korean J Orent Physicol Pathol* 22, 810-814.

Han, M. H., Kim, J. W., Kim, K. Y., Kim, S. G., Yu, G. J., Cho, Y. B., Hwang, H. J., Kim, B. W., Kim, B. W., Kim C. M., Choi, Y. H. 2014a. Single dose oral toxicity of Schisandrae Semen essential oil in ICR mice. *J Life Sci* 24, 191-195.

Han, M. H., Lee, M. H., Hong, S. H., Choi, Y. H., Moon, J. S., Song, M. K., Kim, M. J., Shin, S. J., Hwang, H. J. 2014b. Comparison of anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their mixtures in RAW 264.7 murine macrophages. Journal of life science 24, 329-335.

Hashimoto, T., Tori, M., Asakawa, Y. 1991. Piscicidal sterol acylglucosides from *Edgeworthia chrysantha*. Phytochemistry 30, 2927-2931.

Haung, H. L. and Wang, B. G. 2004. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from Qingdao coastline. J Agric Food Chem 52, 4993-4997.

Heinzemann, A., Daser, A. 2002. Mouse models for the genetic dissection of atopy. Int Arch Allergy Immunol 127, 170-180.

Heo, S. J., Jang, J., Ye, B. R., Kim, M. S., Yoon, W. J., Oh, C. H., Kang, D. H., Lee, J. H., Kang, M. C., Jeon, Y. J., Kang, S. M., Kim, D. K., Kim, K. N. Chromene suppresses the activation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. Food Chem Toxicol 67, 169-175.

Heo, S. J., Yoon, W. J., Kim, K. N., Ahn, G. N., Kang, S. M., Kang,

D. H., Affan, A., Oh, C., Jung, W. K., Jeon, Y. J. 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. Food Chem Toxicol 48, 2045-2051.

Heo, S. J., Yoon, W. J., Kim, K. N., Oh, C. H., Choi, Y. U., Yoon, K. T., Kang, D. H., Qian, Z. J., Choi, I. W., Jung, W. K. 2012. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. Food and Chemical Toxicology 50, 3336-3342.

Hibi, M., Nakajima, T., Hirano, T. 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. J. Mol. Med. 74: 1-12.

Higuchi, M., N. Hisgahi, H. Taki, and T. Osawa. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J Immunol 144, 1425-1431.

Hoffmann-Roder, A., Krause, N. 2004. Synthesis and properties of allenic natural products and pharmaceuticals. Angew Chem Int Ed 43, 1196-1216.

Hseu, Y. C., Wu, F. Y., Wu, J. J., Chen, J. Y., Chang, W. H., Lu, F.

J., Lai, Y. C., Yang, H. L. 2005. Anti-inflammatory potential of *Antrodia camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol* 5, 1914-1925.

Hume, D. A., Wells, C. A., Ravasi, T. 2007. Transcriptional regulatory networks in macrophages. *Novartis Found Symp* 281, 2-18.

Hwang, B. Y., Su, B. N., Chai, H., Mi, Q., Kardono, L. B. S., Afriastini, J. J., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., Wild, R., Fairchild, C. R., Vite, G. D., Rose, W. C., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Swanson, S. M., Kinghorn, A. D. 2004. Silvesterol and episilvesterol, potential anticancer rocaglate derivatives from *Aglaia silvestris*. *J Org Chem* 69, 3350-3358.

Hwang, J. W., Lee, S. J., Kim, Y. S., Kim, E. K., Ahn, C. B., Jeon, Y. J., Moon, S. H., Jeon, B. T., Park, P. J. 2012. Purification and characterization of a novel peptide with inhibitory effects on colitis induced mice by dextran sulfate sodium from enzymatic hydrolysates of *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 33, 993-999.

Hwang, P. A., Chein, S. Y., Chan, Y. L., Lu, M. K., Wu, C. H., Kong, Z. L., Wu, C. J. 2011. Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum*

sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. J Agr Food Chem 59, 2062-2068.

Jang, J. R., Kim, K. K., Mun, S. B., Lim, S. Y. 2009. In vitro anticancer and antioxidant effect of solvent extracts from tuna dried at low temperature vacuum. J Life science 19, 633-638.

Jeong, D. H., Kim, K. B. W. R., Kang, B. K., Jung, S. A., Kim, H. J., Jeong, H. Y., Bark S. W., Ahn, D. H. 2012. Anti-inflammatory activity of the water extract of *Sargassum fulvellum*. Korean Soc Biotechnol Bioeng J 27, 325-329.

Jin, H. J., Jin, D. H. 2007. Screening of seaweed extracts for algicidal substances using a photosensitization effect. J Korean Fish Soc. 40, 22-27.

Joung, E. J., Lee, M. S., Choi, J. W., Kim, J. S., Shin, T. S., Jung, B. M., Kim, J. I., Kim, H. R. 2012. Anti-inflammatory effects of phlorofucofuroekol B-rich ethyl acetate fraction obtained from *Myagropsis myagroides* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells and mouse edema. Int Immunopharmacol 14, 471-480.

Jin, M., Suh SJ., Yang, J. H., Lu, Y., Kim, S. J., Kwon, S. Y., Jo, T. H., Kim, J. W., Park, Y. I., Ahn, G. W., Lee, C. K., Kim, C. H., Son, J. K., Son, K. H., Chang, H. W. 2010. Anti-inflammatory activity of

bark Dioscorea batatas DECNE through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW 264.7 cells via NF- κ B and ERK1/2 inactivation. Food Chem Toxicol 48, 3073-3079.

Johnson, G. L., Lapadat, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 298, 1911-1912.

Ju, M. S., Jeong, H. U., Kim, H. G., Park, G. H., Youn, Y. S., Kim, Y. O., Kim, S. Y., Oh, M. S. 2010. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of Geranii Herba. Kor J Herbology 25, 97-101.

Jung, T. Y. 2014. Single oral dose toxicity test of Choweseuncheng-tang, a polyherbal formula in ICR mice. Korean J Orient Physiol Pathol 28, 53-58.

Jung, Y. S., Eun, C. S., Jung, Y. T., Kim, H. J., Yu, M. H. 2013. Anti-inflammatory effects of Picrasma Quassioides (D.DON) BENN leaves extracts. J Life Sci 23, 629-636.

Kang, C. H., Han, S. H., So, J. S. 2013. Anti-inflammatory effect of chloroform extract from *Potentilla chinensis*. Korean Soc Biotechnol Bioeng J 28, 13-17.

Kang, C. H., Jung, H. Y., Lee, D. H., Park, J. K., Ha, J. U., Lee, S. C., Hwang, Y. I. 2000. Analysis of chemical compounds on tuna

processing by-products. J Korean Soc Food Sci Nutr 29, 981-986.

Kang, J. Y., Khan, M. N. A., Park, N. H., Cho, J. Y., Lee, M. C., Fujii, H., Hong, Y. K. 2008. Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. J Ethnopharmacol 116, 187-190.

Kang, M. C., Lee, J. Y., Ko, R. K., Kim, H. B., Hong, S. H., Kim, G. O. 2008. Melanin inhibitory effect and anti-inflammatory effects of *Dictyota coriacea* extracts derived from adjacent sea of the Jeju island. Koran J Biotechnol Bioeng 23, 32-36.

Kang, S. H., Cho, E. K., Choi, Y. J. 2012. α -Glucosidase inhibitory effects for solvent fractions from methanol extracts of *Sargassum fulvellum* and its antioxidant and alcohol-metabolizing activities. J Life Science 22, 1420-1427.

Khair-El-Din T, Sicher SC, Vazquez MA, Chung GW, Stallworth KA, Kitamura K, Miller RT, Lu CY. 1996. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. J Exp Med 183, 1241-1246.

Kiemer, A. K., Hartung, T., Huber, C., Vollmar, A. M. 2003.

Phyllanthusamarus has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF- κ B pathway. J of Hepatology 38, 289-297.

Kim, B. H., Oh, J. M., Kang, K. W., Kwak, S. H., Yun, S. Y., Lee, C. H., Lee, H. S., Kim, S. K. 2008a. Evaluation of oxy-radical scavenging capacity of fucoidan. J Environ Toxicol 23, 41-45.

Kim, D. H., Hwang, E. Y., Son, J. H. 2013a. Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorius* seed extracts in Raw 264.7 cells. J Life Sci 23, 55-62.

Kim, D. H., Park, S. J., Jung, J. Y., Kim, S. C., Byun, S. H. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedoktang in LPS-activated macrophage cells. Kor J Herbol 24, 39-47.

Kim, D. W., Chi, Y. S., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, H. P. 2002a. Effects of sophoraflavanone G, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2 and in vivo inflammatory response. Arch Pharm Res 25, 329-335.

Kim, H. J., Park, T. S., Jung, M. S., Son, J. H. 2011a. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (Cheongdo Bansi). J Appl Biol Chem 54, 71-78.

Kim, H. R., Kim, D. W., Jo, H. S., Cho, S. B., Park, J. H., Lee, C.

H., Choi, Y. J., Yeo, E. J., Park, S. Y., Kim, S. T., Yu, Y. H., Kim, D. S., Kim, H. A., Cho, S. W., Han, K. H., Park, J., Eum, W. S., Choi, S. Y. 2015. Tat-biliveridin reductase A inhibits inflammatory response by regulation of MAPK and NF- κ B pathways in Raw 264.7 cells and edema mouse model. *Molec Immunol* 63, 355-366.

Kim, J. B., Han, A. R., Park, E. Y., Kim, J. Y., Cho, W., Lee, J., Seo, E. K., Lee, K. T. 2007a. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by porcirin through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull* 30, 2345-2351.

Kim, K. S., Jeong, B. Y., Bae, T. J., Oh, W. S. 1998. Studies on the isolation, refining and utilization of lecithin from skipjack viscera oil. *J Korean Fish Soc* 31, 895-900.

Kim, R. G., Shin, K. M., Chun, S. K., Ji, S. Y., Seo, S. H., Park, H. J., Choi, J. W., Lee, K. T. 2002b. In vitro antiinflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage raw 264.7 cells. *Yakhak Hoeji*. 46: 343-347.

Kim, S. B., Jung, E. S., Shin, S. W., Kim, M. H., Kim, Y. S., Lee J. S., Park, D. H. 2011b. Anti-inflammatory activity of *Camellia japonica* oil. *BMB Rep* 45, 177-182.

Kim, S. H., Choi, D. S., Athukorala, Y., Jeon, Y. J., Senevirathne, M. and Rha, C. K. 2007b. Antioxidant activity of sulfated

polysaccharides isolated from *Sargassum fulvellum*. J Food Sci Nutr 12, 65-73.

Kim, S. Y., Jo, M. J., Hwangbo, M., Back, Y. D., Jeong, T. Y., Cho, I. J., Jee, S. Y. 2013b. Anti-inflammatory effect of *Stevia Rebaudiana* as a results of NF- κ B and MAPK inhibition. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol 26, 54-64.

Kim, Y. J., Park, S. J., Yun, K. J., Cho, Y. W., Park, H. J., Lee, K. T. 2008b. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralens* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. Eur J Pharmacol 584, 175-184.

Kim, Y. J., Son, D. Y. 2012. Antioxidant and inhibitory effects of korean *Panax ginseng* extract on pro-inflammatory mediators in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr 41, 1371-1377.

Kato-Noguchi, H., Tamura, K., Sasaki, H., Suenaga, K. 2012. Identification of two phytotoxins, blumenol A and grasshopper ketone, in the allelopathic Japanes rice variety Awaakamai. J Plant Physiol 169, 682-685.

Kubes, P. 2000. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. Gut 47, 6-9.

Kwak, S. C., Kim, S. A. and Lee, M. S. 2005. The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. J Korean Soc Food Sci Nutr 34, 1143-1150.

Kwon, H. S., Shin, H. K., Kwon, S. O., Yeo, K. M., Kim, S. M., Kim, B. N., Kim, K. 2009. Anti-inflammatory effect of aqueous extract from red pepper on lipopolysaccharide induced inflammatory responses in murine macrophage. J Korean Soc Food Sci Nutr 38, 1289-1294.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lee, A. K., Sung, S. H., Kim, Y. C., Kim, S. G. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. Br J Pharmacol 139, 11-20.

Lee, B. H., Choi, B. W., Chun, J. H. and Yu, B. S. 1996. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. J Korean Ind Eng Chem 7, 1069-1077.

Lee, C. J. 2010. Inhibitory effects of *Sargassum horneri* extracts on atopic disease. Pukyong national university MS thesis.

Lee, E. 2011. Effects of *Ixeris dentata* extract on the production of pro-inflammatory cytokines in the LPS stimulated rat and RAW

264.7 cells. Korean J Plant Res 24, 604-612.

Lee, H. B., B. W. Choi, J. H. Chun, and B. S. Yu. 1996. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. J Korean Ind Eng Chem 7, 1069-1077.

Lee, H. N., Kim, J. K., Kwon, G. T., Shim, J. H., Kim, J. D., Yoon, J. H. 2012a. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from bark of *Acer barbinerve* maxim. J Korean Soc Food Sci Nutr 41, 1242-1247.

Lee, H. S., Jung, H. S., Kuen, H. S. 2000a. Preparation of antibacterial agent from seaweed extract and its antibacterial effect. J. Korean Fish Soc 33, 32-37.

Lee, H. S., Kim, H. J., Choi, J. I., Kim, J. H., Kim, J. G., Chun, B. S., Ahn, D. H., Chung, Y. J., Kim, Y. J., Byun, M. W., Lee, J. W. 2008. Antioxidant activity of the ethanol extract from cooking drips of *Thunus thynnus* by gamma irradiation. J Korean Soc Food Sci Nutr. 37, 810-814.

Lee, J. H., Kim, D. H., Shin, J. W., Park, S. J., Kim, Y. S., Yu, J. Y., Kim, T. J. 2012b. *Eupatorium chinensis* var. *simplicifolium* root extract inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in Raw 264.7 macrophages by inhibiting iNOS and COX-2 expression. J Life Sci 22, 1137-1144.

Lee, J. H., Ko, J. Y., Samarakoon, K., Oh, J. Y., Heo, S. J., Kim, C. Y., Nah, J. W., Jang, M. K., Lee, J. S., Jeon, Y. J. 2013. Preparative isolation of sargachromanol E from *Sargassum siquastrum* by centrifugal partition chromatography and its anti-inflammatory activity. Food Chem Toxicol 51, 54-60.

Lee, K. H., Nam, H. O., Yoon, W. H. 2007. Effect of protein-bound polysaccharide isolated from *Acanthopanax senthopanax* in reducing the toxic effect of cisplatin. Korean J Pharmacogn 38, 1-17.

Lee, S. E., Lee, H., Kim, K., Kim G. S., Kim, Y. O., Soe, S., Choi, H., Lee, E. S., Noh, H., Kim, S. Y. 2011. Anti-inflammatory activity of medicinal plant extracts. Korean J Medicinal Crop Sci 19, 217-226.

Lee, S. H., Oh, H. Y., Leem, J. Y., Yoon, S. 2009. Antioxidant and NO-scavenging activities of *Acanthopanax senticosus* Var. subinermis leaf extracts prepared using ethanol and extrusion processing. Food Sci Biotechnol 18, 1124-1131.

Lee, S. H., Suh, S. J., Lee, K. H., Yang, J. B., Choi, S. U., Park, S. S. 2013. Anti-inflammatory effect of peel extract from citrus fruits. J Food Hyg Safety 28, 342-348.

Lee, S. J., Kim, E. K., Kim, Y. S., Hwang, J. W., Lee, K. H., Choi, D. K., Kang, H., Moon, S. H., Jeon, B. T., Park, P. J. 2012.

Purification and characterization of a nitric oxide inhibitory peptide from *Ruditapes philippinarum*. Food Chem Toxicol 50, 1660-1666.

Lee, S. T., Jeong, Y. R., Ha, M. H., Kim, S. H., Byun, M. W., Jo, S. K. 2000b. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr 29, 342-348.

Lin, M. C., Lin, S. B., Lee, S. C., Lin, C. C., Hui, C. F., Chen, J. Y. 2010. Antimicrobial peptide of an antilipopolysaccharide factor modulates of the inflammatory response in RAW 264.7 cells. Peptides 31, 1262-1272.

Lin, W. J., Yeh, W. C. 2005. Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. Shock. 24, 206-209.

Ljung, T., Lundberg, S., Varsanyi, M., Ohansson, C., Schmidt, P. T., Herulf, M., Lundberg, O., Hellstrom, P. M. 2006. Rectal nitric oxide as biomaker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus non-responders. World J Gastroenterol 12, 3386-3392.

Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Lo R, Helton S. 1999. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the

NF kappa B activity. J Surg Res 82, 216-221.

Majdalawieh, A., Ro, H. S. 2010. Regulation of I κ B α function and NF- κ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. Mediators Inflamm 2010, 1-27.

Makarov, S. S. 2001. NF- κ B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. Arthritis Res 3, 200-206.

Makins, R., Ballinger, A. 2003. Gastrointestinal side effects of drugs. Exper Opin Drug Saf 2, 421-429.

Marks-Konczalik, J., Chu, S. C., Moss, J. 1998. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor κ B-binding sites. J Biol Chem 273, 22201-22208.

Masters, S. L., Simon, A., Aksentijevich, I., Kastner, D. L. 2009. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. Ann Rev Immunol 27, 621-668.

Mathiak, G., Grass, G., Herzmann, T., Luebke, T. 2000. Caspase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS-lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. Br J Pharmacol. 131, 383-386.

McDaniel, M. L., Kwon, G, Hill, J. R., Marshall, C. A., Corbett, J. A. 1996. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med 211, 24-32.

Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. Nature 454, 428-435.

Meisel, H. and FitzGerald, R. J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Curr Pharm Des 9, 1289-1295.

Mo, J., Panichayupakaranant, P., Kaewnopparat, N., Nitiruangjaras, A., Reanmongkol, W. 2013. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid in vivo. J Ethnopharmacol 148, 901-908.

Moncada, S., Higgs, E. A. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. Eur J Clin Invest 21, 361-374.

Moon, J. H., Go, H., Shin, S. M., Kim, K. T. 2013. Anti-inflammatory effect of extracts from *Ligustrum obtusifolium* S. fruits in RAW 264.7 macrophages. J Korea Inst Oriental Med Diagn 17, 263-273.

Oh, H. S., Kim, J. S., Heu, M. S. 2007. Preparation of functional

seasoning sauce using enzymatic hydrolysates from skipjack tuna cooking drip. J Korean Soc Food Sci Nutr 36, 766-772.

Park, J. H. 2010. Isolation and identification of norsesquiterpenes and phenolic compounds from the silkworm droppings. MS Thesis, Kyunghee university.

Park, S. G., Jegal, K. H., Jung, J. Y., Back, Y. D., Byun, S. H., Kim, Y. W., Cho, I. J., Park, S. M., Kim, S. C. 2014. *Leonuri fructus* ameliorates acute inflammation via the inhibition of NF- κ B-mediated nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. Korean J Orient Physiol Pathol 28, 178-185.

Park, Y. M., Won, J. H., Yun, K. J., Ryu, J. H., Han, Y. N., Choi, S. K., Lee, K. T. 2006. Preventive effect of Ginkgo biloba extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor- κ B in RAW 264.7 cells. Biol Pharm Bull 29, 985-990.

Rahman, M. S., Al-Saidi, G. S., Guizani, N. 2008. Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. Food Chemistry 108, 472-481.

Rainsford, K. D. 2007. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. Sub-cell Biochem 42: 3-27.

Ryu, Y. B., Jeong, H. J., Yoon, S. Y., Park, J. Y., Kim, Y. M., Park,

S. J., Rho, M. C., Kim, S. J., Lee, W. S. 2011. Influenza virus neuraminidase inhibitory activity of phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia cava*. J Agric Food Chem 59, 6467-6473.

Saraiva, R. A., Araruna, M. K., Oliveira, R. C., Menezes, K. D., Leite, G. O., Kerntopf, M. R., Costa, J. G., Rocha, J.B., Tomé, A. R., Campos, A. R., Menezes, I. R. 2011. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. J Ethnopharmacol 136, 504-510.

Schmidt, H., Walter, U. 1994. NO at work. Cell 78, 919-925.

Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proc Natl Acad Sci USA 91, 12013-12017.

Seo, D. S., Kim, Y. G., Hwang, K. H., Lee, J. K. 2008. Preparation of hydroxyapatite powder derived from tuna bone and its sintering property. J Kor Ceram Soc 45, 594-599.

Seok, J. H., Roh, H. S., Jeong, J. Y., Ha, H. Y. 2014. Acute oral toxicity study of *Dictamnus dasycarpus* Turcz in SD rats. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol 27, 68-78.

Sheeba, M. S., Asha, V. V. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol

extract inhibits LPS induced COX-2, TNF-alpha and iNOS expression, which is mediated by NF-kappaB regulation, in RAW264.7 cells. J Ethnopharmacol 124, 39-44.

Smith, W. L., DeWitt, D. L., Garavito, R. M. 2000. Cyclooxygenase: structures, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem 69, 145-182.

Song, I. S., Chang, D. K., Kim, C. Y. 1998. Current status of Crohn's disease in Korea. Korean J Intern Med 55, 158-168.

Southan, G. J., Szabo, C. 1996. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. Biochem Pharmacol 51, 383-394.

Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsang, C. H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G., Glass, C. K. 2000. 5-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci USA 97, 4844-4849.

Sultana, M., Verma, P. K., Raina, R., Prawez, S., Dar, M. A. 2012. Quantitative analysis of total phenolic, flavonoids and tannin contents in acetone and n-hexane extracts of *Ageratum conyzoides*. Int J Chem Tech Res 4, 996-999.

Sung, Y. Y., Kim, D. S., Yang, W. K., Nho, K. J., Seo, H. S., Kim,

Y. S., Kim, H. K. 2012. Inhibitory effects of *Drynaria fortunei* extracts on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. J Ethnopharmacol 144, 94-100.

Tak, P. P., Firestein, G, S. 2001. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest 107, 7-11.

Tezuka, Y., Irikawa, S., Kaneko, T., Banskota, A. H., Nagaoka, T., Xiong, Q., Hase, K., Kadota, S. 2001. Screening of chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. J Ethnopharmacol 77, 209-217.

The standard of toxicity test of pharmaceutical products: notification of Korea Ministry of Food and Drug Safety under the tile of 2014-136. Cited December 2014.

Tizard, I. R. 1986. Immunology: an introduction inflammation. 2nd ed. Saunders College Publishing, New York, NY, USA. p423-441.

Towbin, H. T., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76, 4350-4354.

Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G., Tak, P. P. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a

comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117, 244-279.

Tracey, K. J., Wei, H., Manogue, K. R., Fong, Y., Hesse, D. G., Nguyen, H. T. 1988. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. *J Exp Med* 167, 1211-1227.

Veras, H. N. H., Araruna, M. K. A., Costa, J. G. M., Coutinho H. D. M., Kerntopf, M. R., Botelho, M. A., Menezes, I. R. A. 2013. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* cham: possible mechanism of action. *Phytother Res* 27, 179-185.

Wang, X., Luo, Y., Liao, W. B., Zhang, J., Chen, T. M. 2013. Effect of osteoprotegerin in combination with interleukin-6 on inhibition of osteoclast differentiation. *Chin J Traumatol* 16, 277-280.

Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, Hurley LA, Roche HM. 2007. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *J Nutr Biochem* 18, 250-258.

Yang, E. K., Ham, Y. M., Lee, W. J., Lee, N. H., Hyun, C. G. 2013a. Anti-inflammatory effects of apo-9'-fucoxanthinone from the brown alga, *Sargassum muticum*. *Daru* 21, 1-7.

Yang, E. J., Ham, Y. M., Yang, K. W., Hyun, C. G. 2013b. Sargachromenol from *Sargassum micracanthum* inhibits the lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators in

RAW 264.7 macrophages. Scientific World Journal 2013, 1-6.

1.

Yoon, W. J., Lee, J. A., Kim, K. N., Kim, J. Y., Park, S. Y. 2007. In vitro anti-inflammatory activity of the *Artemisia fukudo* extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. Korean J Food Sci Technol 39, 464-469.

Yum, H. S. 2009. Anti-inflammatory effects of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* and *Potentilla chinensis* extracts. MS Thesis, Inha University.

Yun, H. Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M. 1996. Neurobiology of nitric oxide. Crit Rev Neurobiol 10, 291-316.

Yun, K. J. and Lee, E. Y. 2012. Effects of hot aqueous and ethanol extract from *Lonicera japonica* Flos on NO and PGE₂ in macrophage. J Korean Acupuncture Moxibustion Soc 29, 67-74.

Zhang, G. and Ghosh, S. 2000. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. J Endotoxin Res 6, 453-457.

감사의 글

저 드디어 졸업합니다!

길고 힘들게만 느껴졌던 석사과정을 이렇게 마치면서 돌이켜 생각해 보니 힘들기만 했던 과정이 아니라, 여러 방면에서 많이 성장할 수 있었던 기회였다고 생각합니다.

먼저 꿈을 정하지 못해 방황하던 저에게 꿈을 찾도록 도와주시고, 석사 과정 동안 부족한 저를 위해 아낌없는 격려와 지도를 해 주신 지도 교수 안동현 교수님께 진심으로 감사드리며 존경의 마음을 표합니다. 그리고 저의 논문 심사를 맡아주신 조영제 교수님과 전병수 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다. 아울러 언제나 학문적인 격려와 충고를 아끼지 않으신 김선봉 교수님, 이양봉 교수님, 양지영 교수님, 김영목 교수님께도 감사드립니다.

학부 3학년부터 시작하여 약 4년 반의 실험실 생활에 있어 부족한 점이 많은 저에게 진심어린 충고와 도움을 주신 꽃봉우리 언니와 민지언니께 정말 감사하고, 다현언니, 금동선배, 슬아언니, 현지언니를 비롯한 멋진 선배님들과 동기 시우선배, 원민이, 그리고 제 밑에서 저를 많이 도와주고 항상 밝게 잘 따라와준 연욱이 나경이에게도 고맙습니다. 원민이, 나경이, 연욱이, 지혜, 난영이, 선희가 앞으로 닥칠 어려운 위기들 속에서도, 그것을 성장의 기회로 삼고 각자에게 주어진 시간동안 끝까지 최선을 다하여 자신의 꿈을 향해 가능성을 높이는 소중한 석사 생활을 했으면 좋겠습니다. 그리고 항상 밝은 표정으로 선배들을 도와주는 실험실 학부생 후배들에게도 감사와 격려의 말씀을 전합니다.

항상 제가 원하는 길을 찾아 갈 수 있도록 아낌없는 격려와 지원을 해주시고 끝까지 저를 믿고 지지해 준 소중한 우리 가족, 아빠, 엄마, 하나뿐인 동생 준구 모두 사랑합니다. 사랑하는 할머니, 외할머니, 외할아버지, 삼촌, 숙모, 이모, 이모부 감사합니다. 항상 긍정적이고 남을 배려하고 아버지와 지혜로운 어머니 존경합니다. 덕분에 힘들어도 낙천적인 자세로 슬기롭게 해낼 수 있었던 것 같습니다.

마지막으로 내 어려운 점을 자신의 일처럼 생각해주고 항상 나에게 긍정적인 기운을 주며 나를 지지해주는 내 소중한 친구들에게 감사의 말을 전하고 싶습니다. 친구지만 항상 당당하고 멋진 해나루, 언니인 듯 언니아닌 언니같은 양씨니, 해피 바이러스 윤용이, 나의 대나무 숲 아퍼니, 장난꾸러기 승규, 0.1초 지현우 택니, 의젓한 지후니, 온화한 미소 무철웅, 박목석 웁니, 구세주1 가요미, 구세주2 현지니, 진격의 한술이 그리고 우리 제일여고 내가 제일 사랑하는 친구들 해란짱, 동바, 혜면이, 꿈땡, 혜정이, 무학여중 친구들, 용초 친구들 모두 사랑하고 고마워. 너희들을 만나게 되어 정말 감사하고, 앞으로도 지금까지와 같이 서로 힘이 되는 친구로 할매, 할배 될 때까지 영원히 잘 지내자. 그리고 새로운 출발선에 선 해라니 화이팅! 널 항상 응원해.

위의 모든 분들에게 한번 더 감사의 인사를 전하며, 그동안 주신 관심, 격려, 도움, 꾸지람 등을 발판 삼아 새로운 출발선에서 꿈을 위해 앞으로도 열심히 달리겠습니다. 정말 감사합니다.