



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

工學碩士 學位論文

참치안구유 및 잔가시 모자반
추출물의 항염증 효과



2013年 8月

釜慶大學校 大學院

食品工學科

鄭多玹

工學碩士 學位論文

참치안구유 및 잔가시 모자반
추출물의 항염증 효과

指導教授 安東賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함



2013年 8月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

鄭 多 玟

鄭多玆의 工學碩士 學位論文으로 認准함

2013年 8月



주 심 수산학박사 조 영 제 ㉠

위 원 공학박사 전 병 수 ㉠

위 원 농학박사 안 동 현 ㉠

목 차

Abstract	1
서 론	4
재료 및 방법	
1. 실험재료	9
1-1. 원료	
1-2. 동물	
1-3. 시약	
2. 추출물 제조	10
3. 방 법	
3-1. 세포배양	11
3-2. 세포 독성 측정	11
3-3. Nitric Oxides 분비량 측정	12
3-4. 염증 관련 cytokines 분비량 측정	12
3-5. iNOS 및 COX-2 발현량 측정	13
3-6. 귀 부종 측정 및 조직 관찰	14
3-7. 단기 독성 평가	14

4. 통계처리	15
---------------	----

결과 및 고찰

1. 참치안구유의 염증 억제 효과

1-1. 세포 독성 측정	16
1-2. Nitric oxides 생성 억제 효과	18
1-3. 염증관련 cytokines 생성 억제 효과	20
1-4. iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과	25
1-5. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰	29
1-6. 단기 독성 평가	32

2. 잔가시 모자반 추출물의 염증 억제 효과

2-1. 세포 독성 측정	34
2-2. Nitric oxides 생성 억제 효과	36
2-3. 염증관련 cytokines 생성 억제 효과	39
2-4. iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과	45
2-5. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰	51
2-6. 단기 독성 평가	55

요 약	58
-----------	----

참 고 문 헌	61
---------------	----

Anti-inflammatory Activity of the Tuna eyeball oil and *Sargassum micracanthum* Extracts

Da-Hyun Jeong

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

Abstract

Inflammation is protective physiological response of the body to activate the immune system in response to a variety of stimuli, including infections and tissue injury. However, chronic inflammatory response may induce various diseases such as sepsis, rheumatoid arthritis, and cancer. Macrophage plays critical roles in immune reaction, allergy, and inflammation. These cells induce inflammatory reaction, and initiate and maintain specific immune responses by releasing different types of cytokines. Macrophage activation by lipopolysaccharides (LPS), which are derived from gram-negative bacteria cell walls, results in the release of several inflammatory mediators including nitric oxide (NO), cyclooxygenase (COX)-2, Interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF)- α .

Over-expression of the inflammatory mediators in macrophage is involved in many inflammation related diseases, such as sepsis, rheumatoid arthritis, and cancer. Currently, most broadly used medicines for treating inflammation-related diseases are non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). However, the long-term administration of NSAIDs with a potent activity can result in various and severe adverse effects. Therefore, a strong interest in developing new anti-inflammatory drugs from various natural products has been growing. It may inhibit or prevent a variety of inflammatory diseases by suppressing the secretion of these inflammatory mediators in activated macrophages. Therefore, plant-derived natural compounds have been targeted for the treatment of various inflammatory diseases due to high effectiveness and very few side effects. Therefore, the anti-inflammatory effects of *Sargassum micracanthum* ethanol extracts (SMEE), *Sargassum micracanthum* water extracts (SMWE), and Tuna eyeball oil (TEO) were investigated using LPS-induced inflammatory response in this study. The murine macrophage cell line RAW 264.7 cells were used and MTT assay was performed to measure the cell proliferation ability. The nitric oxide (NO), TNF- α , IL-6 and IL-1 β secretion were measured in LPS-induced RAW 264.7 cells by ELISA. The expression of

iNOS, COX-2 and NF- κ B p65 protein were studied by immunoblotting. The Balb/c mice were used for an *in vivo* acute toxicity test, and ICR mice were purchased to evaluate croton oil-induced ear edema. As a results, there were no cytotoxicity in the macrophage proliferation treated with SFEE and SSEE compared to the control. NO levels decreased with increasing concentration of SFEE and SSEE and was inhibited up to 50%. Moreover, the secretion of IL-6, TNF- α , and IL-1 β were suppressed in a dose-dependent manner, especially, IL-6 and IL-1 β inhibition activities were over 50% at 0.1 μ g/mL. The rated of formation of edema in the mouse ear was reduced at the highest dose tested compared to that in the control. Moreover, in acute toxicity test, no mortalities occurred in mice administered 5000 mg/kg body weight of SMEE, SMWE and TEO over 2 weeks observation period.

These results suggested that SMEE, SMWE, and TEO may have significant effects on inflammatory factors and be a potential anti-inflammatory therapeutic materials.

서론

최근 경제가 발전함에 따라 생활환경 및 식생활의 변화로 인하여 전 세계적으로 암, 당뇨병, 고혈압, 비만 및 혈관성 질환 등의 생활습관 병이 차지하는 비율이 매년 증가하고 있다. 이와 더불어, 현대 사회의 급격한 산업 발달로 인한 환경 변화 그리고 이에 따른 스트레스의 증가 등을 포함하여 다양한 요인으로 인하여 면역 조절 이상으로 인하여 유발된 염증이 지속됨으로써 아토피, 천식 등의 만성 염증 질환이 증가하고 있다(Sung et al., 2012; Heinzmann & Daser, 2002).

염증 반응은 상처나 세균 감염 등의 물리적, 화학적 자극이 일어날 때 손상 부위를 복구시키는 신체 방어 기전 중 하나이며, 이 중 만성 염증은 체내의 과도한 방어 반응으로 염증이 지속되는 상태를 말한다(Yoo et al., 2012). 지속적인 염증반응은 점막 손상을 촉진시켜 결과적으로 통증, 부종, 발적, 발열 등을 일으켜 기능 장애를 유발하며 관절염 및 암 등의 발생과 깊은 연관을 갖고 있다(Ljung et al., 2006) 염증 반응에 관여하는 주요 세포는 macrophage로 알려져 있으며, 여러 자극이나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화되어, 통증, 부종, 열 등의 염증 반응을 유발하고, 염증 부위로 면역 세포의 이동을 촉진시킨다(Lee et al., 2004). RAW 264.7과 같은 대식 세포 또는 단핵구는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소인 lipopolysaccharide(LPS)의 자극에 의해 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 IL-6와 같은 염증매개성 cytokine들의 분비를 촉진한다. 이러한 염증 매개 물질들의 형성은

arachidonic acid가 cyclooxygenase(COX)의 작용을 거쳐 leukotriene, thromboxane, prostaglandin 등으로 바뀌는 과정 및 nitric oxide(NO)의 대량 생성에 관여함으로써 염증매개에 큰 역할을 하며, 숙주에 치명적 결과를 초래한다고 알려져 있다(McDaniel et al., 1996; Kim et al., 2009). 이 중 NO는 반응성이 높은 물질로 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며 NOS는 constitutive NOS와 inducible NOS로 나누어진다. 특히 iNOS는 외부 자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 의해 자극받게 되면 hepatocyte, smooth muscle cells, bone marrow cells, monocytes, macrophages 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생산한다고 보고되고 있다(Lee et al., 2007). COX는 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 prostaglandin으로의 변화를 촉진시키는 효소로써 COX-1, COX-2의 isoform이 존재한다(Smith et al., 2000). COX-1은 대부분의 조직에서 발현되어 인체의 항상성 유지에 관여하는 반면, COX-2는 growth factors, cytokines 및 lipopolysaccharide 등의 다양한 자극에 의해서 macrophage나 monocyte 등의 세포에서만 다량 발현되며, 이로 인해 발생된 prostaglandin은 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다(Bishop-Bailey et al., 2002; Seibert et al., 1994). 또한, 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 Nuclear transcription factor-kappa B(NF- κ B)는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 transcription factor이다(Ghosh & Hayden, 2008). NF- κ B는 p50과 p65로 구성되어 핵 안

으로 들어가 전사인자로서 작용하여 iNOS, COX-2 및 염증관련 cytokine을 합성하며, 일반적으로 세포질에서 I κ B α 와 결합함으로 NF- κ B의 작용이 억제된다(Majdalawieh & Ro, 2010).

이와 같은 염증반응과 밀접하게 관련되어 있는 염증매개 물질의 생성과 생성에 관여하는 효소의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증 질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다. 지금까지 개발된 합성 항염증제는 크게 스테로이드(히드로코르티손, 프레드니솔론, 베타메타손)와 비스테로이드(아스피린, 인도메타신, 이부프로펜)로 나눌 수가 있으며, 이들은 대부분 위장, 신장 및 심장 질환 등의 부작용을 나타내어 (Dogne et al., 2006; Makins & Ballinger, 2003), 그 사용이 제한받고 있다. 따라서 현재 보다 안전하고 효과 있는 천연 유래 치료제의 개발이 필요하다. 최근에는 항염증 활성을 갖는 식품 및 생약추출물을 이용한 각종 염증성 질환의 치료제 개발이 활발히 이루어지고 있다 (Lee et al., 2011; Kwon et al., 2009).

현재 천연물을 이용한 염증반응 완화에 대한 연구로는 구판(Baek et al., 2012), 오가피(Lee et al., 2007), 금은화(Yun et al., 2007)등 생약재의 항염증에 관한 연구들과 청시닥나무(Lee et al., 2012), 등골나무(Lee et al., 2011), 홍화자(Kim et al., 2013), 왕귀똥나무(Kim et al., 2012), 녹두 및 대두(Imm et al., 2010) 등의 육상식물에 대한 연구들이 주를 이루고 있다. 하지만 이러한 연구는 대부분 육상 식물을 대상으로 한 것으로 이미 한계치에 이르고 있으므로 새로운 건강 기능성 소재 개발을 위해서는 해양식물에 대한 연구가 필요하다. 이는 해조류가 극심한 환경에서 생육하므로 육상 식물과는 다른 성분과 생리

활성이 있을 것으로 추측되기 때문이다(Cho & Choi, 2010).

삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라는 예로부터 다양한 수산물들이 다량으로 소비되어 왔다. 이 중에서 참치(*Thunnus thynnus*)는 고단백 식품으로 영양적으로 우수할 뿐 아니라 동맥 경화를 예방하고 항암작용이 있다고 알려져 있다(Choi et al., 2011; Je et al., 2007). 참치유에는 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA) 같은 오메가- ω 계 고도 불포화 지방산이 다량 함유되어 있어 식품분야에 다양하게 이용 할 수 있는 장점을 가지고 있으며(Roh et al., 2005), EPA와 DHA는 고지혈증 및 심혈관계 질환에 대한 효능뿐만 아니라 망막, 두뇌의 인지질의 주요 구성 성분으로 성장에 필수 지방산으로 알려져 있다(Simopoulos, 1991; Casillo et al., 2000). 본 연구에서는 참치 안구에서 분리 및 정제된 참치안구유(Tuna eyeball oil)를 사용하였다.

또한 한국은 해조류 생산이 전 세계 4위에 달할 만큼 해조류 이용 및 양식 산업이 매우 발달해 있으며, 해조류의 다양한 생리 활성에 대한 연구가 진행되면서 식품, 의약품 및 화장품 분야의 이용이 빠르게 증가되고 있다(Cha & Kim, 2008). 실제 해조류의 고지혈증 및 고혈압 예방(Bae, 2004; Joo et al., 2003), 항당뇨(Lee et al., 2009), 항돌연변이(Choi et al., 2005), 항암(Jin & Jin, 2007), 항염증(Kang et al., 2008) 및 항응고(Lim et al., 2008; Yoon et al., 2000) 등의 기능들이 보고되면서 해조류를 건강 기능성 식품 원료로 인식하고 있다. 특히 갈조류 중 항염증 효과가 있는 물질로는 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리한 fucoxanthin (Heo et al.,

2010)과 감태(*Ecklonia cava*)에서 분리된 phlorotannin (Ryu et al., 2009) 등이 보고되고 있다. 최근에는 해조류의 fucoidans과 같은 다당류의 항혈전(Joo et al., 2003), 항암(Oh et al., 2003) 및 중금속 제거 활성(Choi et al., 2005)이 각광받고 있다.

본 연구에서 사용되어진 잔가시 모자반(*Sargassum micracanthum*)은 모자반목 모자반과에 속하는 갈조류로 우리나라 인근 해역에서 쉽게 채취할 수 있는 대표적인 해조류이다. 잔가시 모자반에 관한 연구로는 항비만(Lee et al., 2012) 및 항산화(Kim et al., 2012; Ham et al., 2010)에 관한 일부 연구가 수행되고 있다.

참치안구유 및 잔가시 모자반과 같이 다양한 기능성을 가지고 있는 풍부한 수산 자원은 이용 가능성에 비해 식품분야에 적용하는 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 참치안구유 및 잔가시 모자반 추출물을 이용하여 LPS로 활성화 된 RAW 264.7 대식세포에서 염증 매개물질들의 생성 억제 효과를 측정하였으며, 아울러 항염증 활성을 갖는 기능성 식품으로의 가능성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 원료

본 실험에 사용한 참치안구유(Tuna eyeball oil)는 (주)동원에서 제공 받은 것으로 4℃에서 저장하며 사용하였다. 잔가시 모자반(*Sargassum micracanthum*)은 부산 연화리에서 채취한 것으로 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후, 이를 분말화 하고 진공 포장하여 -20℃에서 저장하며 사용하였다.

1-2. 동물

생후 8주령의 수컷, ICR 마우스를 오리엔트바이오(Orient Co., Seongnam, Korea)로부터 구입하여 귀 부종 실험에 사용하였으며, 생후 10주령의 암컷, Balb/c 마우스는 단기 독성 평가 실험에 사용하였다. 마우스는 온도 20±2℃, 습도 50±10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물실에서 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 및 β -actin의 항체와 anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxidase는 Santa Cruz(San Diego, CA)에서 구입하여 사용하였다. BCA protein assay kit 및 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Pierce(IL, USA) 제품을 구입하여 실험에 이용하였다.

2. 추출물 제조

분말 상태의 잔가시 모자반에 10배량의 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 이와 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였다. 에탄올 추출 후 남은 잔사는 37°C에서 건조하여 물 추출에 사용하였다. 물 추출물은 건조된 잔사에 10배량의 초순수를 가하여 에탄올과 동일하게 3회 반복 추출하였다. 추출한 상층액은 여과지로 여과하여 37°C에서 감압농축기(RE200,yamato Co., Tokyo, Japan)로 농축한 뒤 건조하였다. 건조된 시료는 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

3. 방법

3-1. 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°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

3-2. 세포 독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell 1x10⁶ cells/mL를 well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 1 µg/mL의 LPS와 참치안구유와 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/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 재배양하고 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.

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

3-3. Nitric Oxides 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess 반응(Lee et al., 2000)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 µg/mL의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL의 모자반 및 비틀대 에탄올 추출물을 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(NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

3-4. 염증 관련 cytokines 분비량 측정

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°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 NO를 측정 하였던 것과 동일한 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 반응 시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 M H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후, microplate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3-5. iNOS 및 COX-2 발현량 측정

배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, lysis buffer를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, 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, CA, USA)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 B의 발현 양을 검토히기 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 X-ray 필름(Kodak X-Omat blue film, Perkinelmer, Waltham, USA)에 감광하였다.

3-6. 귀 부종 측정 및 조직 관찰

ICR 마우스에 참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg·body weight 농도로 200 μ L씩 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 측정하였으며 croton oil 처리한 후 두께의 증가를 부종의 형성으로 간주하였다.

조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 100 mg/mL 농도로 20 μ L씩 도포하고 15분 뒤, 5% croton oil을 20 μ L씩 도포하였다. 6시간 뒤, diethylether로 마취사 시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72 시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

3-7. 단기 독성 평가

Balb/c 마우스를 실험 시작 전에 4~6시간 정도 절식시킨 후에 참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 300, 2000 및 5000 mg/kg·body weight 농도로 경구 투여 하였다. 6시간 동안 비정상적

인 행동 등의 경과를 관찰하였고 2주까지 지속적으로 관찰하였다.

4. 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. 참치안구유의 염증 억제 효과

1-1. 세포 독성 측정

대식세포는 NO, PGE₂, leukotriene 및 pro-inflammatory cytokine 들의 2차 매개물을 생산하고 분비한다. 이런 물질들은 선천성 및 후천성 면역을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 그러나 이런 물질들이 과잉 생산되었을 때에는 세균성 패혈증, 류마티스성 관절염, 만성 염증, 자가 면역 질환 등을 유발하기도 한다(Hilliquin et al., 1997). 따라서 본 연구에서는 염증에 중요한 역할을 하는 대식세포에 대해 참치안구유의 세포 독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 참치안구유를 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL의 농도로 첨가하여 배양한 결과, 모든 처리 농도에서 RAW 264.7 세포 증식능이 negative control에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였으며, 참치안구유는 RAW 264.7 세포의 증식을 유도하는 것을 관찰하였다(Fig. 1). 이는 청시닥나무(*Acer babrbinnerve*) 추출물에 대한 세포 독성 실험 결과, 농도 의존적으로 세포 증식률이 증가하는 경향을 보였으나 세포독성은 나타나지 않은 결과와 유사하다(Lee et al., 2012).

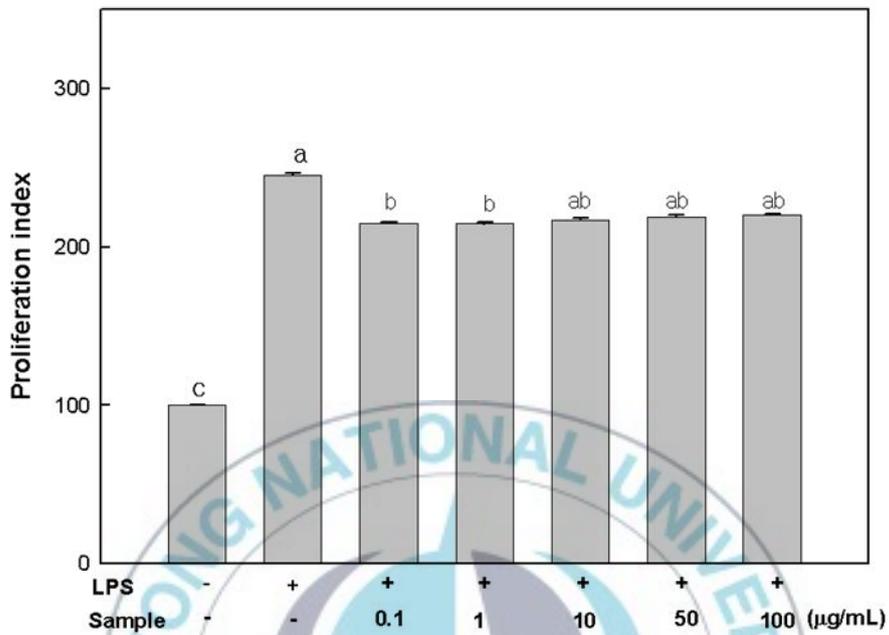


Fig. 1. Effect of tuna eyeball oil on the proliferation of RAW 264.7 cells. Proliferation index = sample O.D/control O.D*100. ^{a-c} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

1-2. Nitric Oxides 생성 억제 효과

NO는 체내 방어기능, 신호 전달 기능, 신경 독성, 혈관 확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다. NO 자체는 반감기가 6~10초 정도로 매우 짧으며, NO를 형성하는 NOS들은 L-arginine을 L-citrullin으로 전환시키면서 NO를 생성하며, 이들 NOS는 iNOS에 의한 발현성이 절대적으로 많으며, 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다(Schmidt & Walter, 1994). 참치안구유 처리에 의한 NO 생성 정도를 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화 시킨 후, 참치안구유를 각 농도 별로 (0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL) 첨가하고 생성된 NO를 griess 시약을 이용하여 측정하였다. 참치안구유를 처리하였을 경우, NO 생성량이 LPS 처리구 보다 유의적으로 감소함을 확인하였다. positive control의 경우 negative control과 비교하여 4배 이상 분비량이 증가하였으나, 참치안구유를 0.1 µg/mL의 낮은 농도 처리에서도 낮은 NO 분비량을 보였다. 특히 10, 50 및 100 µg/mL 농도에서는 50% 이상 감소한 것을 확인하였다(Fig. 2). 이는 오메가- ω 지방산의 항염증 효과를 측정된 연구결과와 유사하며(Emily et al., 2011), 참치안구유와 같은 어유(fish oil)는 EPA와 DHA와 같은 long-chain polyunsaturated fatty acid인 오메가-3 지방산의 함량이 높은 식품으로 알려져 있다(Din et al., 2004).

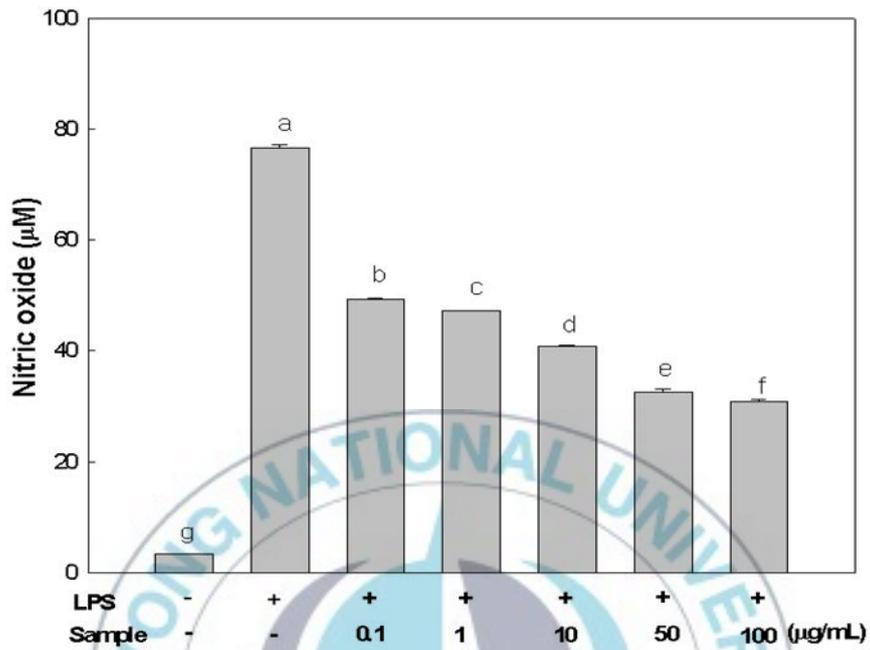


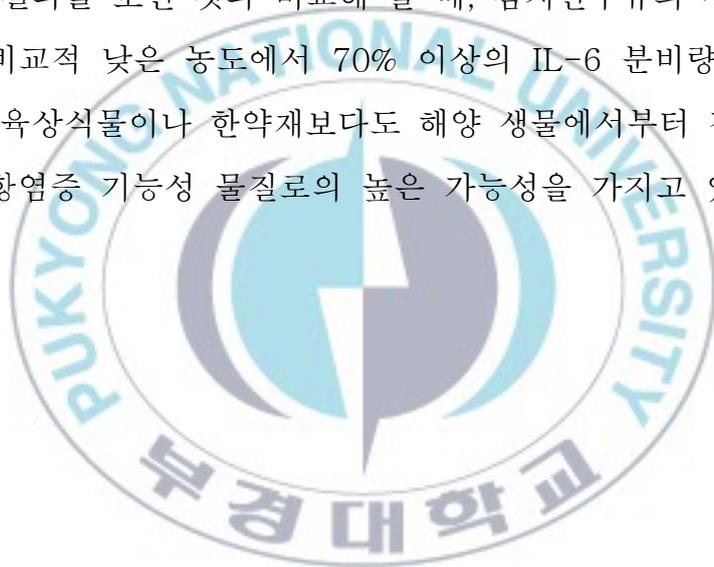
Fig. 2. Effect of tuna eyeball oil on production of nitric oxides in RAW 246.7 cells.

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

1-3. 염증 관련 cytokines 생성 억제 효과

인체에서 염증반응이 진행되기 위해서는 NO와 PGE₂와 같은 염증 매개물 이외에 면역 반응에서 필연적으로 염증성 사이토카인이 동반되는데, 대표적인 사이토카인으로는 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 이다(Kim et al., 2013). IL-6는 단핵구를 포함한 여러 종류의 세포에서 분비되며 다양한 기능을 가지는 대표적인 pro-inflammatory cytokine 중의 하나로 초기 면역 반응에서 중요한 역할을 한다. 종양괴사 인자인 TNF- α 는 체내에서 대식세포나 림프구 등 백혈구에 의해 생성되는 cytokine으로 정상상태에서는 만들어지지 않으며 LPS 등에 의한 대식세포의 자극으로 합성되어 분비된다(Djeu et al., 1988). IL-1 β 는 IL-6, TNF- α 와 함께 대표적인 염증성 cytokine으로 NO를 생성하게 하는 매개물질이며, 국소염증을 발생시키고 T세포의 활성화, B세포의 성숙 및 NK cell을 활성화 시키는 cytokine이다(Chae et al., 2007; Delgado et al, 2003). 따라서 참치안구유가 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS처리 후, 참치안구유를 농도별로 처리하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 모두 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. IL-6 및 IL-1 β 의 경우 참치안구유를 50 μ g/mL 농도로 처리하였을 때, 그 분비량이 각각 85.08 ± 0.92 및 15.66 ± 2.06 으로 낮은 값을 나타내었다. 또한 LPS 단독 처리 시 IL-6 및 IL-1 β 분비량이 371.93 ± 8.33 및 60.64 ± 4.13 인 것과 비교해 볼 때, 참치안구유가 각각 77 및 74% 이상의 높은 감소를 보임을 확인할 수 있었다. TNF- α 의 경우, LPS 단독 처리 시 2414.43 ± 2.32 인 것과 비교하여 1

$\mu\text{g/mL}$ 농도 처리의 경우 1017.08 ± 3.09 으로 58% 이상의 감소를 보여 TNF- α 분비 억제도 큰 효과가 있음을 나타내었다(Fig. 3-5). 이는 씬바귀 추출물 첨가 시 RAW 264.7 세포 실험에서 TNF- α 의 분비량이 첨가 농도에 의해 감소하는 경향을 보임에 따라 IL-1 β 의 분비량 또한 감소한 연구결과와 유사하다(Lee, 2011). 다른 연구로, 애기땅빈대(Park et al., 2011)와 청서익기탕(Lee, 2011) 추출물 처리 농도가 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 LPS 단독 처리구에 비해 IL-6 분비량이 약 50% 이상 감소한 결과를 보인 것과 비교해 볼 때, 참치안구유의 경우에는 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 비교적 낮은 농도에서 70% 이상의 IL-6 분비량 감소를 보임에 따라 육상식물이나 한약재보다도 해양 생물에서부터 정제된 참치안구유가 항염증 기능성 물질로의 높은 가능성을 가지고 있다고 사료된다.



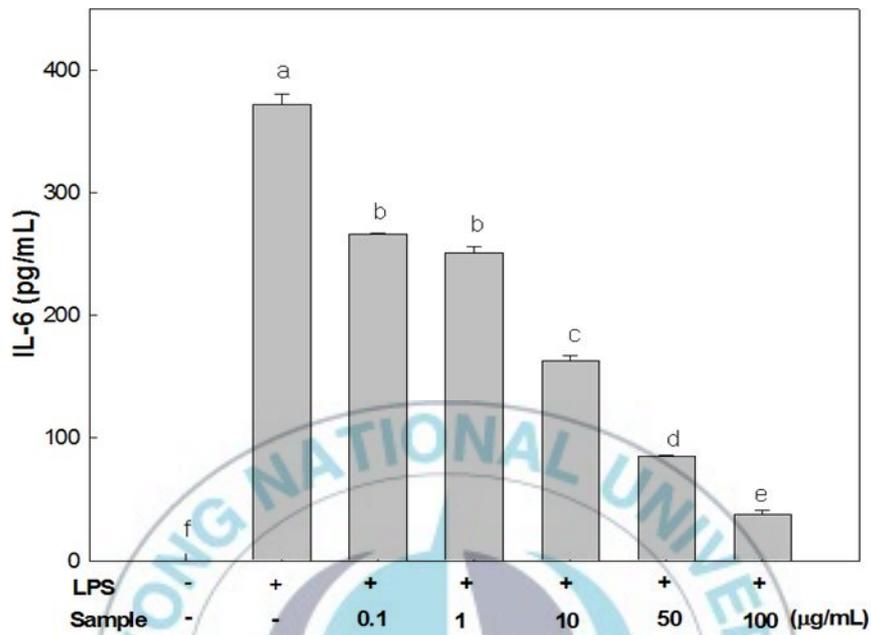


Fig. 3. Effect of tuna eyeball oil on production of IL-6 in RAW 246.7 cells.

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

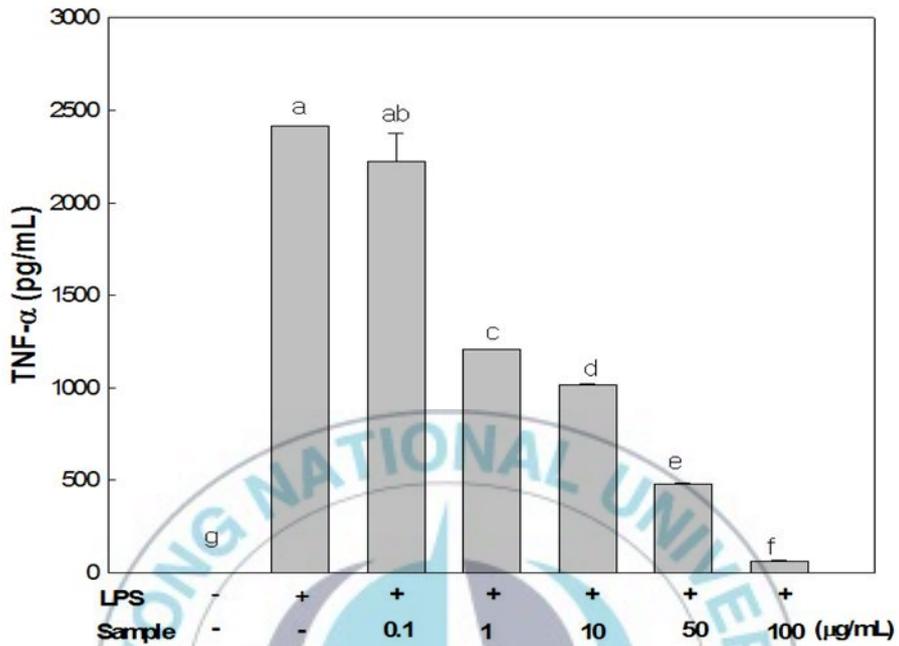


Fig. 4. Effect of tuna eyeball oil on production of TNF- α in RAW 246.7 cells.

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

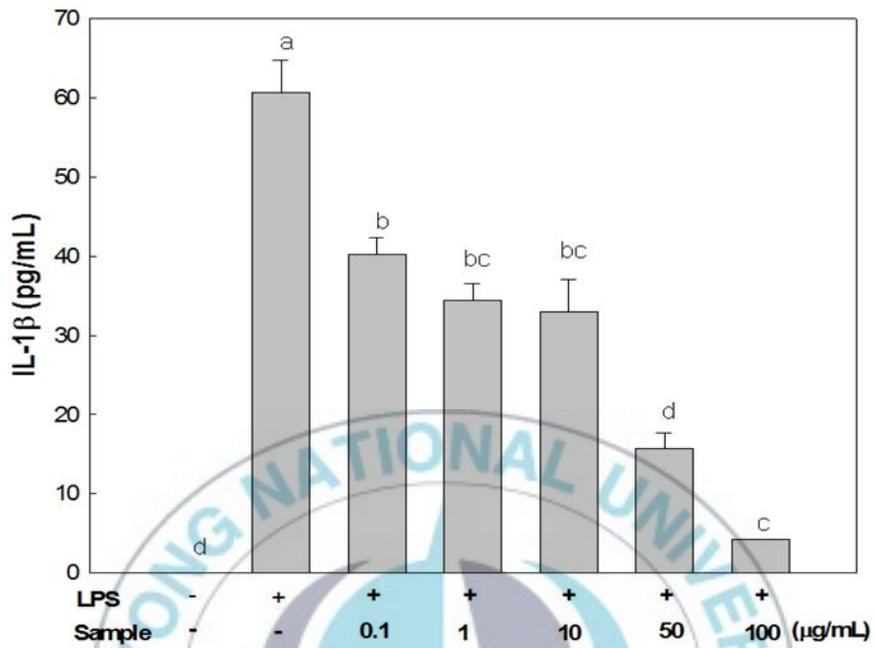


Fig. 5. Effect of tuna eyeball oil on production of IL-1 β in RAW 246.7 cells.

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

1-4. iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과

일반적으로 NO는 생체 내에서 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하며 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 하며(Kubes, 2000), neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS) 그리고 inducible NOS(iNOS) 세 가지 형태의 NOS에 의해 합성된다. nNOS와 eNOS는 세포내에 항상 존재하지만, iNOS는 interferon- γ , LPS 그리고 다양한 염증유도 사이토카인에 노출되는 경우에만 발현된다(Moncada et al., 1991). 따라서 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성되고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다(Yun et al., 1996). COX는 arachidonic acid를 prostaglandins(PGs)으로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽 보호, 신장 기능의 유지 등 정상적 생체 기능에 작용하지만 COX-2는 염증 매개 물질인 PGE₂를 형성시킨다(Duerksen-Hughes et al., 1992). 따라서 염증 반응에서 생성되는 물질 중 iNOS, COX-2와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있다(평이14). Raw 264.7 세포에 참치안구유를 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하고 iNOS 발현량을 측정된 결과(Fig. 6), LPS 단독처리구와 비교하였을 때 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수가 있었으며 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 PBS 처리구와 유사한 발현량을 나타냈다. 이는 넘취 정유의 iNOS 발현량 억제 연구(Kim et al., 2002)와 유사하다. 또한 천궁으로부터 얻은 에센셜 오일을 raw 264.7 세포

에 처리하고 iNOS의 발현량을 측정한 결과(Lim et al., 2010)와 유사하였으며, 천궁 에센셜 오일의 경우 50 µg/mL 농도 처리구에서 50% 이상의 감소를 나타냈으나 참치안구유는 10 µg/mL 농도로 처리 시 약 50% 이상 감소함을 보여 더 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. Raw 264.7 세포에 참치안구유를 0.1-100 µg/mL 농도로 처리하고 COX-2 발현량을 측정한 결과(Fig. 7), 참치안구유를 50-100 µg/mL 농도로 처리하였을 때, LPS 단독 처리구에 비해 약 65% 이상의 억제 효과를 나타냈으며 100 µg/mL 농도 처리구의 경우 PBS 처리구보다 더 낮은 발현량을 나타냈다. 이러한 결과는 카멜리아 오일을 raw 264.7 세포에 0.1-0.5 mg/mL 농도로 처리하고 COX-2의 발현량을 측정한 결과(Kim et al., 2011)와 유사하였으며, Kim 등(2006)이 어유를 마우스에 식이한 후 피부 조직에서의 COX-2의 발현량을 측정한 결과와도 같은 경향을 나타냈다. 또한 참치안구유를 처리함으로써 iNOS 및 COX-2 발현량의 동시 억제 효과는 curcumin과 오메가-3 지방산 혼합물의 iNOS 및 COX-2 발현량 억제 결과와 유사한 경향을 나타냈다(Swamy et al., 2008). 이러한 결과를 종합 해 볼 때, 참치안구유는 LPS에 의해 형성되는 iNOS의 발현 억제 뿐만 아니라 COX-2 발현도 억제시키며 항염증에 효과가 있을 것으로 사료된다.

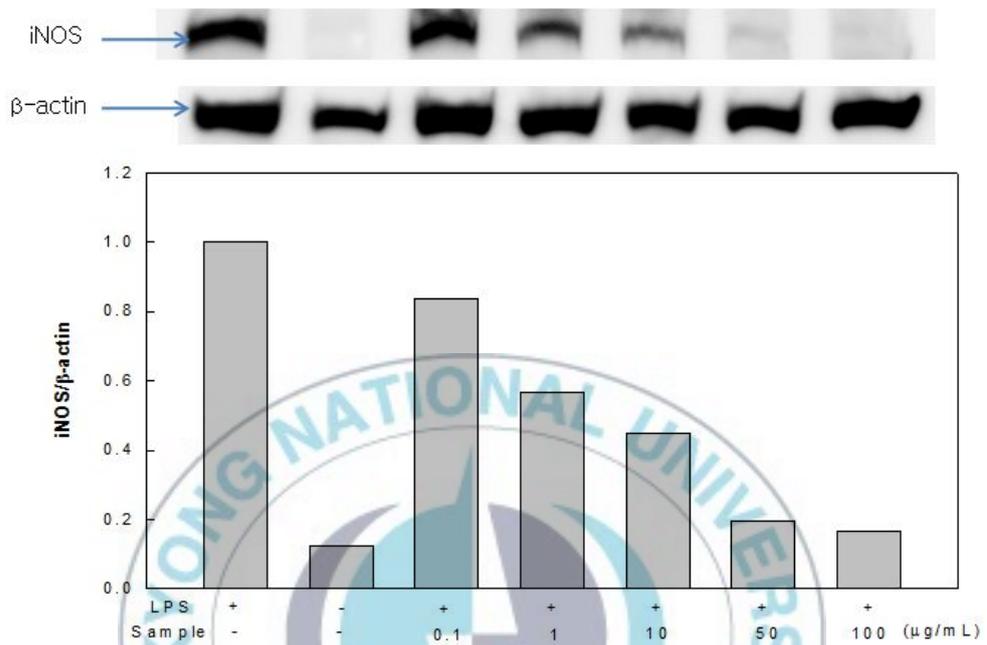


Fig. 6. Effect of tuna eyeball oil on LPS-induced iNOS expression in RAW 246.7 cells.

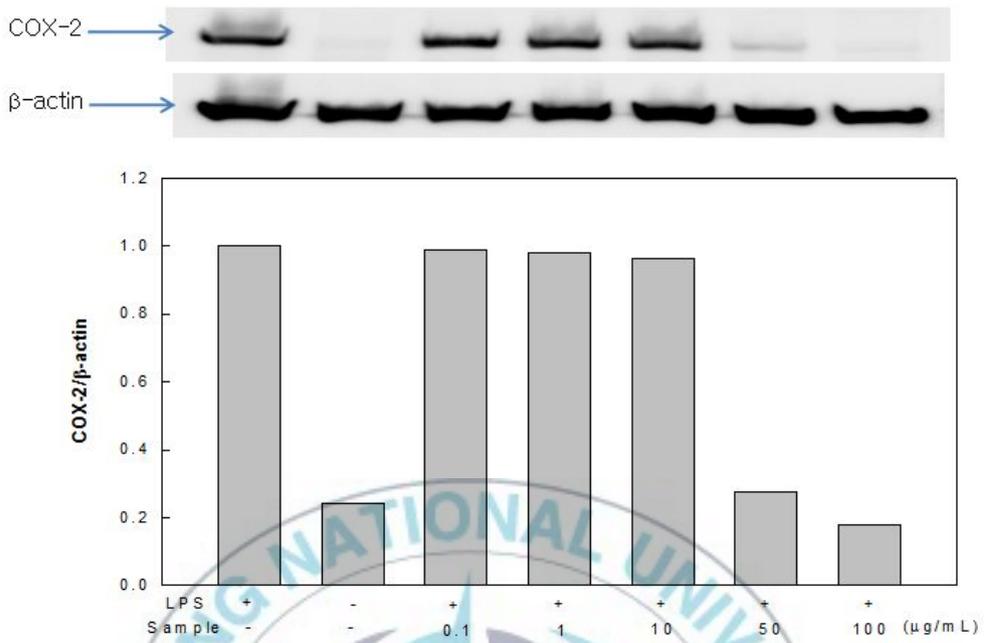


Fig. 7. Effect of tuna eyeball oil on LPS-induced COX-2 expression in RAW 246.7 cells.

1-5. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

피부는 외부 환경의 여러 유해 물질로부터 몸을 보호하고, 몸의 온도와 수분 조절 및 외부 변화를 감지하는 등의 기능을 가진 장기로서, 제일 먼저 몸을 보호하기 때문에 끊임없이 병원체에 의해 손상 된다. 손상된 부위를 복구 시키려는 일련의 생체 과정으로서 혈관확장, 부종 등의 생리 현상이 나타나며 이는 피부 염증에서 일어나는 대표적인 반응으로 이 반응을 억제하는 효과를 실험적으로 검증함으로써 특정 약리 물질의 항염증 효과를 증명할 수 있다(Hahm et al., 2008). 참치안구유를 10, 50 및 250 mg/kg 농도로 200 μ L씩 경구투여 한 후, croton oil로 염증 유발하고 귀 두께를 측정된 결과이다(Fig. 8). control과 비교하여 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소한 것을 확인하였다. 특히, 참치안구유 250 mg/kg 농도에서 positive control인 prednisolon 처리구와 비교하였을 때, prednisolon 50 mg/kg 처리와 유사하게 감소하였으며 현재 사용되고 있는 합성 스테로이드제인 prednisolon과 유사한 효과를 나타내는 것을 확인하였다. H&E 및 T&B 염색을 통한 조직 관찰 결과도 동일한 경향을 나타내었다(Fig. 9). 이러한 결과는 *Stephania tetrandrase*(방기)의 fangchinoline과 tetrandrine을 20-80 mg/kg 농도로 처리한 결과(Choi et al., 2000)와 유사한 경향을 나타냈으며 *Vanillosmopsis arborea* 에센셜 오일을 귀에 도포 처리하고 귀 부종 억제율을 측정된 결과(Leite et al., 2011)와도 유사함을 확인하였다. 참치안구유를 식이함으로써 염증 반응 중 하나인 부종에 효과가 있는 것으로 미루어 보아, 참치안구유는 염증 치료제로써의 소재로 이용될 가치가 충분할 것으로 사료된다.

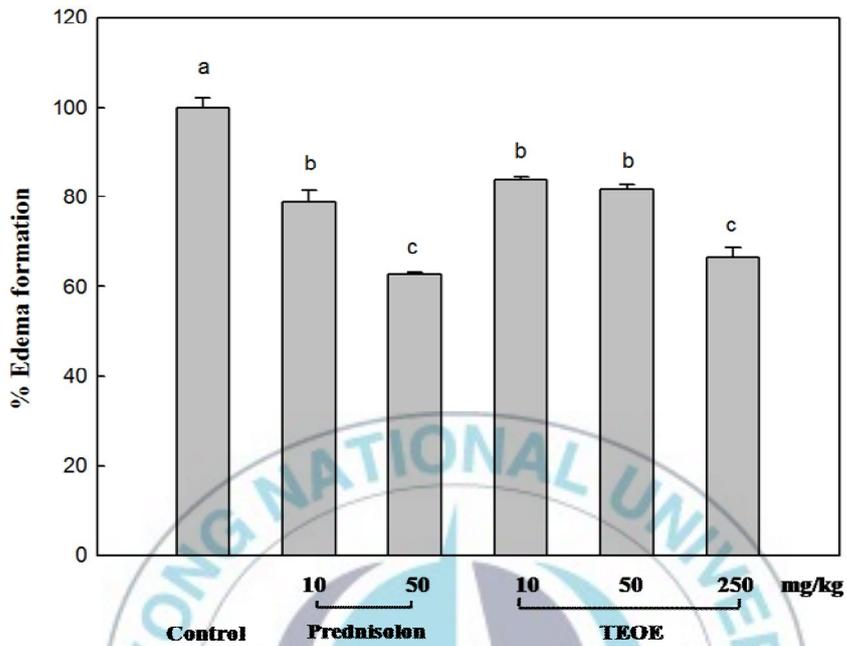


Fig. 8. Inhibition of tuna eyeball oil against croton oil-induced mouse ear edema.

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

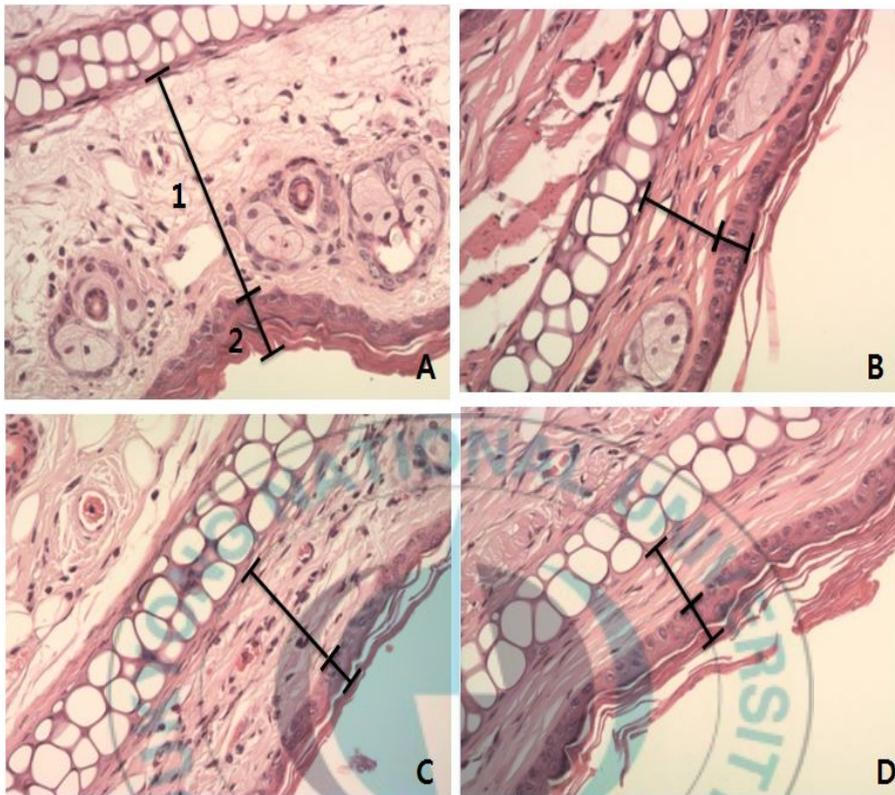


Fig. 9. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of Croton oil 5% (v/v) in acetone (A–C) or vehicle acetone (D, non-inflamed), stained with hematoxylin–eosin and examined under light microscopy (magnification: 200×). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (A), prednisolone 0.08 mg/ear (B) and Tuna eyeball oil 20 µL/ear (C). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively.

1-6. 단기 독성 평가

국민들의 건강에 대한 관심 증가와 더불어 각종 만성질환에 대한 관심이 증가하였다. 최근, 의약품으로 인해 일어날 수 있는 부작용을 최소화시키고 건강을 유지시키거나 질병을 예방할 수 있는 기능성 식품의 활용이 증가하고 있으며 기능성 식품 시장은 지속적으로 확대되고 있다(Choi et al., 2004; Ko et al., 2004). 따라서 기능성 식품 소재로써 이용 가능성을 알아보기 위해 참치안구유를 300, 2000 및 5000 mg/kg 농도로 200 μ L씩 경구투여하고 2주간 행동변화 및 치사율을 관찰하였다(Table 1). 경구투여 후 4시간까지 행동 변화를 관찰하였을 때, 5000 mg/kg 농도 처리구에서 2개체에서 30분 정도 약간 흥분 상태를 보였으나 1시간 이후 진정하였다. 2주간 치사율은 0%로 나타났다. 유사한 연구로 흰점박이꽃무지의 기능성 식품 재료로써의 활용 가능성을 검증하기 위해 단기 독성 평가를 실시한 결과 그 안전성을 검증하였으며(Park et al., 2012), 천연 물질에서 추출된 기능성 물질을 활용한 다양한 식품 개발이 요청됨에 따라 기능성 식품 시장 또한 확대되고 있다(Ko et al., 2011). 따라서 동물실험을 통해 참치안구유가 인체에도 무해 할 것으로 사료되며 참치의 부산물로써 이용이 미비한 참치안구유는 새로운 기능성 식품 소재로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

Table 1. Mortality of mice treated orally with tuna eyeball oil

	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	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg·body weight	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5000 mg/kg·body weight	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5



2. 잔가시 모자반 추출물의 염증 억제 효과

2-1. 세포 독성 측정

대식세포는 염증 반응 시에 NO와 같은 활성 산소종 및 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하므로 항염증 효과를 검증하는 염증 모델로 많이 사용된다(Higuchi et al., 1990; Willeaume et al., 1996). 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT 방법을 이용하였다. MTT assay는 살아있는 세포가 tetrazolium dye를 환원하는 효소에 의해 불용성인 formazan을 형성하는 것을 측정하는 방법으로 간접적으로 세포증식능을 확인하는 방법이다(Kang et al., 2012). 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 0.1, 1, 10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 배양한 결과, 모든 처리 농도에서 RAW 264.7 세포 증식능이 negative control에 비해 유의적으로 증가한 것을 확인하였으며, LPS 단독 처리 시와 유사하게 증식하는 것을 확인하였다(Fig. 11). 이는 왕귀퉁나무잎 물 추출물 및 에탄올 추출물의 세포 독성 평가 결과와 유사하며(Kim et al., 2012), 홍화자 분획물의 대식세포에 대한 독성 결과와도 유사함을 나타내었다(Kim et al., 2013). 따라서 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물은 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 높은 세포 생존율을 보여 독성이 없는 것으로 사료된다.

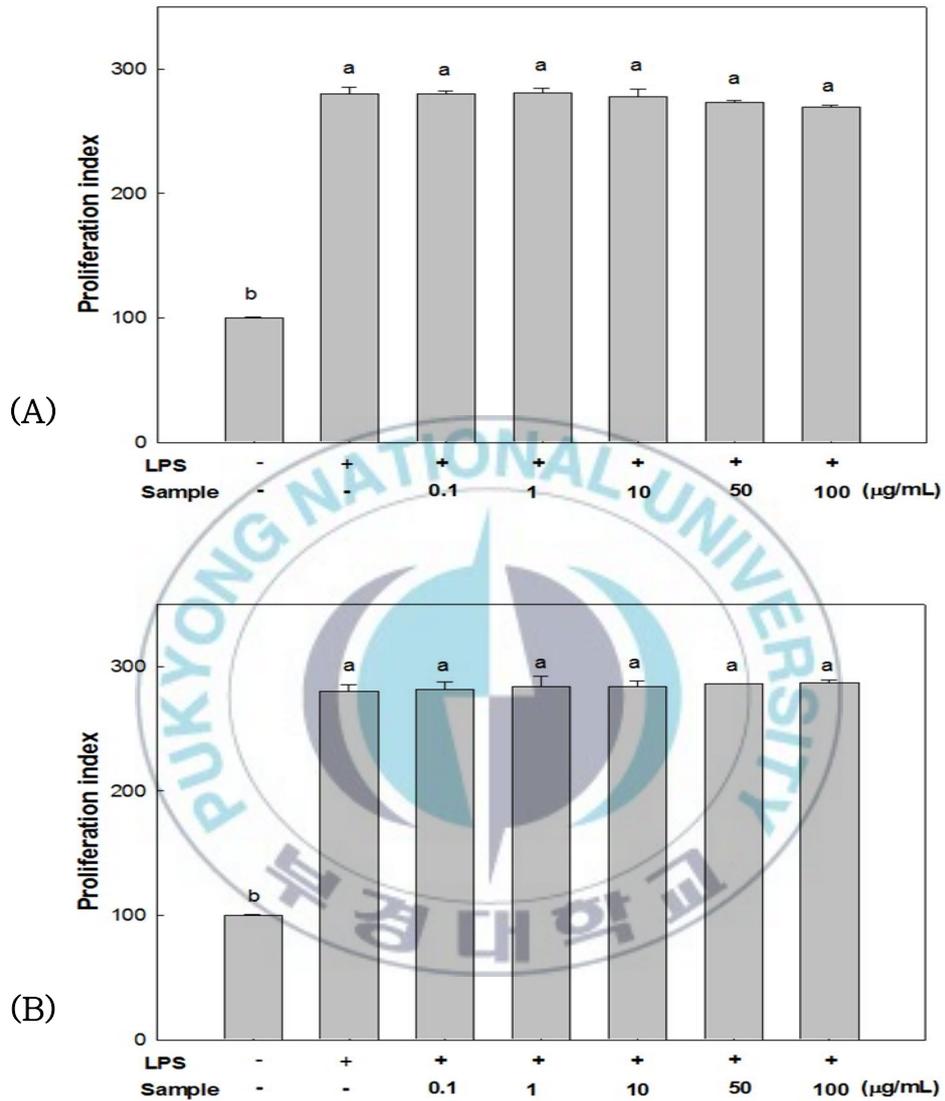
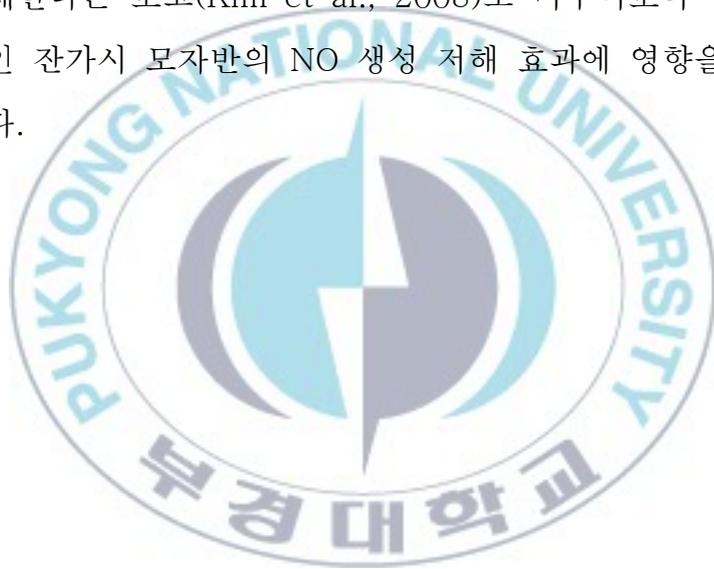


Fig. 11. Effect of *Sargassum micracanthum* (A) ethanol and (B) water extract on the proliferation of RAW 264.7 cells. Proliferation index = sample O.D/control O.D*100. ^{a-b} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

2-2. Nitric Oxides 생성 억제 효과

NO는 NO 합성 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역 반응, 세포독성, 신경 전달계 및 혈관 이완 등 여러 생물학적인 과정에 관여하며 농도에 따라 세포 기능 유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포 독성을 일으키기도 한다(Kim et al., 2004). 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물 처리에 의한 NO 생성 정도를 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화 시킨 후, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 각 농도별로 (0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL) 첨가하고 생성된 NO를 측정하였다. LPS 처리 후 NO 생성량은 정상세포에 비해 8배 이상 증가되었으며, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 처리하였을 경우 NO 생성량이 유의적으로 감소함을 확인하였다. 특히 잔가시 모자반 에탄올 추출물 0.1 µg/mL의 낮은 농도 처리에서도 현저히 낮은 NO 분비량을 보여 잔가시 모자반 에탄올 추출물이 NO 생성 저해에 미치는 효과가 탁월함을 관찰하였으며, 잔가시 모자반 물 추출물의 경우에는 50 µg/mL 농도에서 낮은 NO 분비량을 보였다(Fig. 12). 따라서 잔가시 모자반 에탄올 추출물이 물 추출물보다 더 효과적으로 NO 생성을 억제하는 것으로 사료된다. 일반적으로 에탄올 추출 시에 유기 용매에 추출되는 소수성 물질과 가용성인 친수성 물질이 모두 추출되는 것으로 알려져 있는데(Lee et al., 2009) 이로 미루어 볼 때, NO 생성을 저해하는 물질은 에탄올에 용출이 잘 되는 소수성 물질일 것으로 생각된다. 이는 팽생이 모자반(*Sargassum honeri*) 에탄올 추출물 처리에 따라 농도 의존적으로 NO 분비량 감소

를 보인 결과(Lee, 2010)와 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 으로부터 분리된 fucoxanthin이 높은 NO 저해능을 보인 연구결과(Heo et al., 2010)와 유사하다. fucoxanthin은 carotenoid 색소에 함유되어 있으며 갈조류에도 존재하는 것으로 알려져 있으며 특히 free radical 반응에 의해 생성되는 활성 산소로부터 세포와 조직을 보호하는 중요한 물질로 보고되어 있다(Giovanucci, 1999). 또한 갈조류의 대표적인 성분인 fucoidan이 RAW 264.7 세포에서 NO 생성과 iNOS 발현을 억제한다는 보고(Kim et al., 2008)로 미루어보아 이러한 성분이 갈조류인 잔가시 모자반의 NO 생성 저해 효과에 영향을 미친 것으로 사료된다.



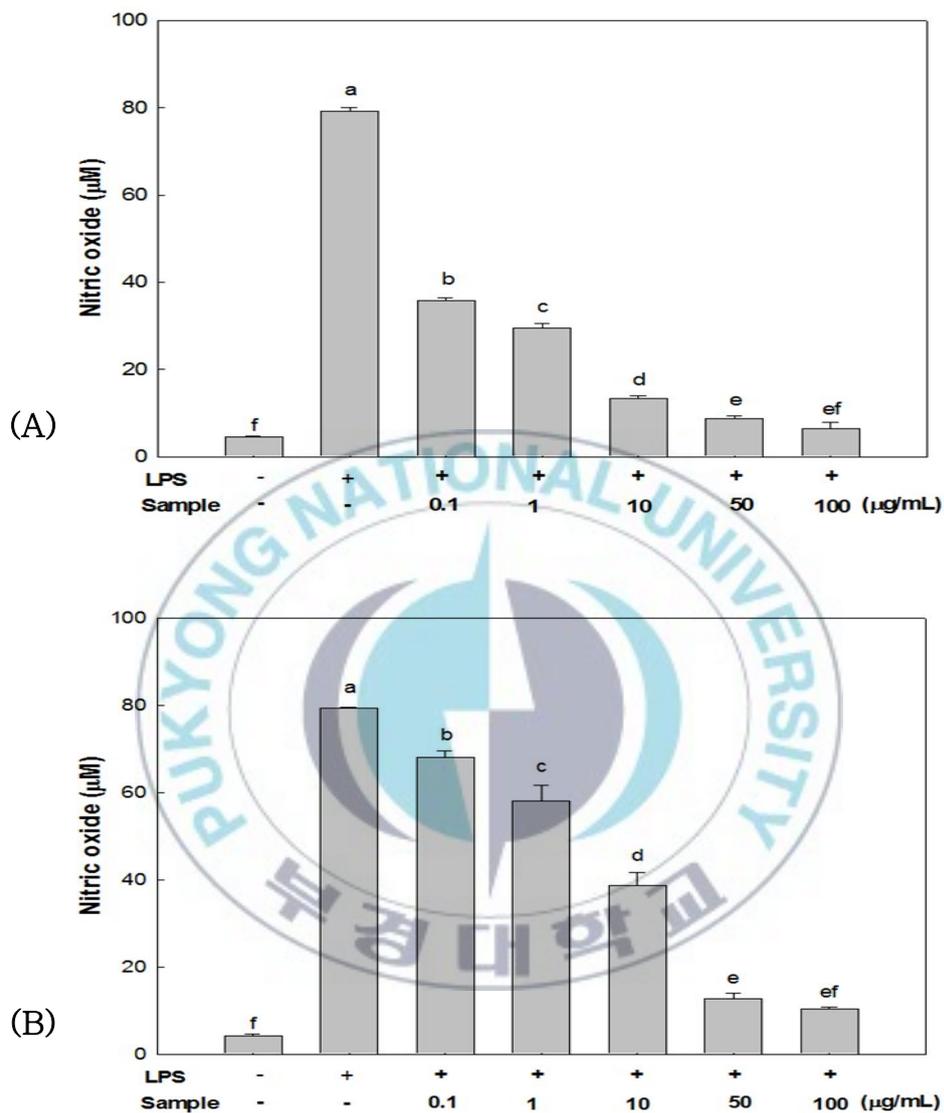


Fig. 12. Effect of *Sargassum micracanthum* (A) ethanol and (B) water extract on production of nitric oxides in RAW 246.7 cells. ^{a-f} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

2-3. 염증 관련 cytokines 생성 억제 효과

IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인은 염증 반응을 매개하는 물질로 초기 염증 반응에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (Tizard, 1986). 독소로 잘 알려진 LPS는 TNF- α 및 IL-6 등의 염증성 사이토카인의 발현을 촉진하고, 그 결과 iNOS와 COX-2와 같은 염증 매개 조절인자에 의해 NO와 PGE₂가 생성되어 염증이 유발된다 (Posadae et al., 2000). IL-6는 체내에서 과잉 생산 될 경우 악성 종양이나 자가 면역질환 및 감염성 질환 등의 여러 가지 질환을 유발함에 따라 다양한 염증성 질환에서 IL-6 분비량이 항상 증가하는 것으로 보고되어 있다(Chae et al., 2007; Delgado et al., 2003). 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물이 IL-6 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해, RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후 추출물을 농도별로 처리하고 분비량을 측정하였다. 그 결과, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물의 농도에 따라 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 특히 에탄올 추출물의 경우, 50 μ g/mL 농도에서 물 추출물과 비교하여 현저히 낮은 분비량을 보임을 확인하였다(Fig. 13). 이는 모자반 에탄올 추출물을 처리한 후 IL-6 분비량을 측정한 결과 50 μ g/mL의 비교적 낮은 농도에서 50% 이상의 감소를 보인 결과(Kim, 2012)와 유사하다. 또한 잔가시 모자반 물 추출물 보다 에탄올 추출물의 IL-6 분비량 억제에 있어서 뛰어난 효과를 보인 경향은 같은 갈조류인 팽생이 모자반을 이용한 염증 억제 연구(Lee, 2010)와 동일한 결과임을 확인하였다.

TNF- α 는 여러 급성 또는 만성 염증 질환의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하게 되며, TNF- α 의 합성 조절이 이들 질환의 치료에 이용될

수 있다(Tracey et al. 1998; Beutler et al., 1989). 따라서 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물이 염증 유발 원인이 되는 주요 cytokine 인 TNF- α 의 생성 억제에 미치는 영향을 알아보았다. 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물의 모든 처리구에서 그 분비량이 농도 의존적인 감소를 보였으며, 비교적 낮은 농도인 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 낮은 분비량을 보였다(Fig. 14). LPS 단독 처리 시 2517.94의 분비량에 비해 에탄올 및 물 추출물은 1292.35 ± 18.35 및 1650.13 ± 14.48 으로 각각 49 및 35% 이상의 높은 감소율을 나타냈다. 이러한 결과는 발효시킨 대황 물 추출물 및 에탄올 추출물의 항염증 억제 연구와 유사하다(Kim et al., 2011). 대황 물추출물 및 에탄올 추출물의 농도 의존적으로 TNF- α 분비량이 감소하였으며, 에탄올 추출물 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 57% 억제됨을 보고하였다. 이를 잔가시 모자반 에탄올 추출물과 비교하였을 때, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 약 70% 이상의 감소를 보여 더 뛰어난 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물이 TNF- α 생성 억제에 효과적이며 잔가시 모자반 에탄올 추출물의 경우 그 효과가 더 탁월한 것으로 사료된다.

IL-1 β 은 염증 반응을 촉진하며 면역계를 자극하는 염증 유발 인자로 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙 등에 관련하며(Kim et al., 2011), 종양의 침습에도 관련이 있다고 알려져 있다(Delgado et al., 2003). 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물이 IL-1 β 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS로 활성화 된 RAW 264.7 세포로부터 분비된 IL-1 β 분비량을 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물 모두 추출물 처리 농도에 따라 그 분비량이 유의

적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 15). 특히, 에탄올 추출물에 있어서 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서부터 약 50% 이상 높은 분비량 감소를 보였다. 이는 급성기 염증 반응에서 혈액 내 TNF- α 및 IL-1 β 의 농도가 급격히 증가하며 IL-1 β 분비량이 TNF- α 분비와 상호작용을 나타낸다(Mathiak et al., 2000)는 보고에 따라, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물 처리에 의한 TNF- α 분비량 감소와 비슷한 경향을 나타내는 것으로 보인다. 이러한 결과를 종합 해 볼 때, 잔가시 모자반 에탄올 추출물에 포함되어 있는 phlorotannin이 46.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 비교적 높은 함량을 보임에 따른 결과(Yoon et al., 2009)에서 비롯된 것으로 사료된다. Phlorotannin은 갈조류에서 주로 추출되어지는 phenolic compound로써 항산화, 항균 항알레르기 및 항염증 등의 생리활성을 보인다고 알려져 있다(Li et al., 2011; Jung et al., 2009). 따라서 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 분비량 감소에 있어서 phlorotannin이 주된 물질로 작용되었을 것으로 추정되며, 이에 대한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

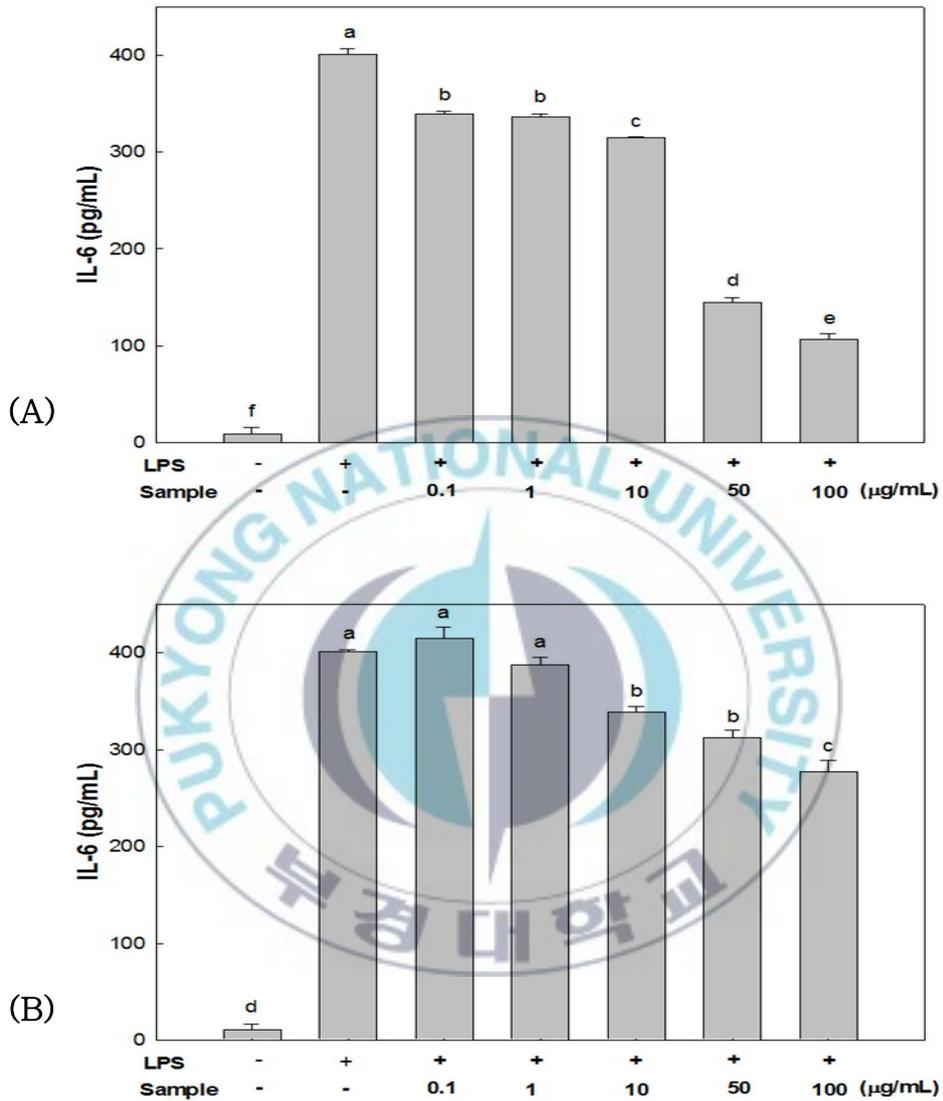


Fig. 13. Effect of *Sargassum micracanthum* (A) ethanol and (B) water extract on production of IL-6 in RAW 246.7 cells. ^{a-f} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

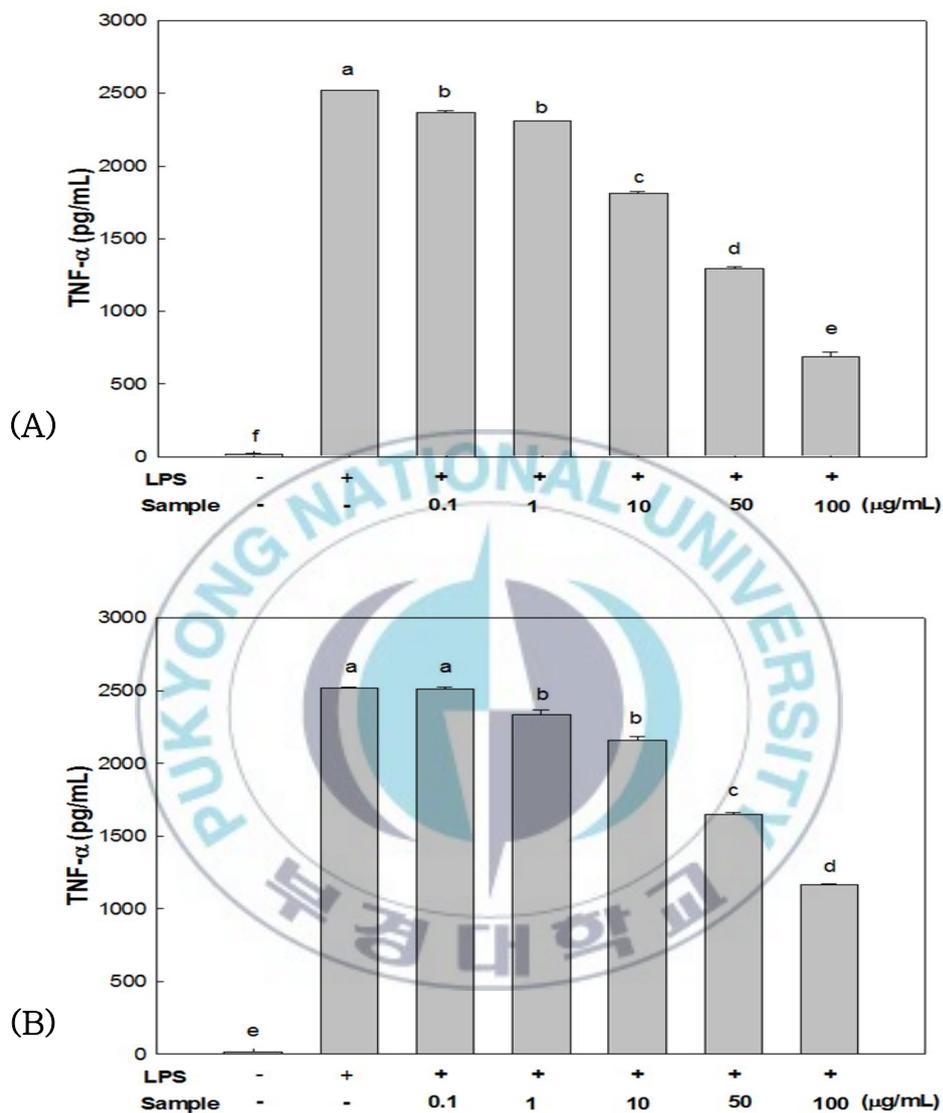


Fig. 14. Effect of *Sargassum micracanthum* (A) ethanol and (B) water extract on production of TNF- α in RAW 246.7 cells. ^{a-e} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

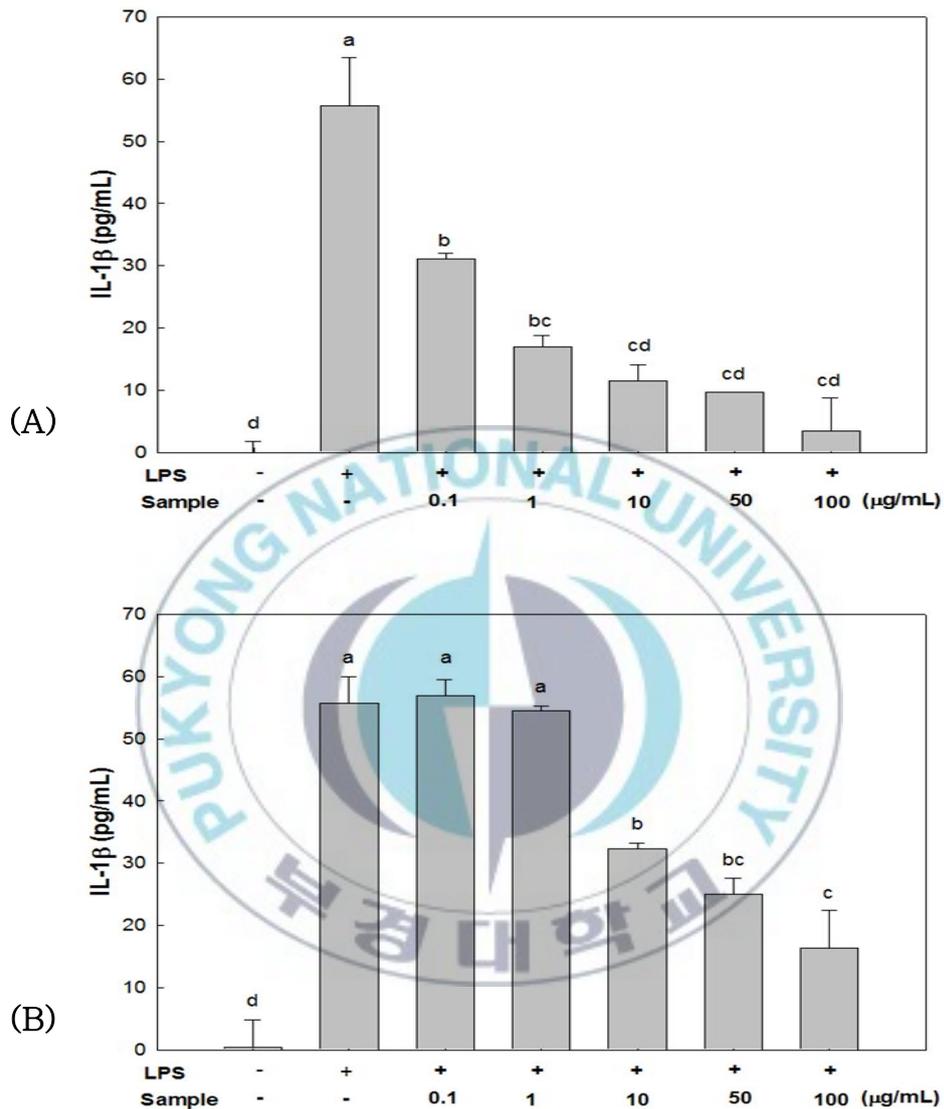


Fig. 15. Effect of *Sargassum micracanthum* (A)ethanol and (B)water extract on production of IL-1 β in RAW 246.7 cells. ^{a-d} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

2-4. iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2002; Tezuka et al., 2001). COX는 cyclooxygenase와 peroxidase 활성을 모두 가지고 있는 효소이다. Cyclooxygenase 기능으로서 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변환하고, peroxidase 기능으로서는 endoperoxide를 prostaglanin으로 변환시키며, prostaglanin은 parostaglandins, thromboxane 및 prostacyclins의 전구체로 사용된다. COX-1은 모든 세포에 존재하면서 정상 세포의 항상성을 유지하지만 COX-2는 급성 염증 반응에서 prostaglandins의 합성에 관여하며 LPS 및 cytokine에 의해 발현이 유도된다(Hume and Wells., 2007; Lin et al., 2005). 잔가시 모자반 에탄올 추출물에 의한 염증 억제 기전을 확인하기 위해 western blot을 실시하여 iNOS 및 COX-2 발현을 측정하였다(Fig. 16,17). 그 결과, 추출물 농도가 높아질수록 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었고 iNOS 및 COX-2 모두 50 µg/mL 농도에서 LPS 단독 처리구와 비교 시, 약 50%의 억제 효과를 보였다. 잔가시 모자반 물 추출물을 농도(0.1-100 µg/mL)에 따라 처리하고 iNOS 및 COX-2의 발현을 측정하였다(Fig. 18,19). 그 결과, 에탄올 추출물 처리구와 마찬가지로 농도의존적으로 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. iNOS의 경우, 1 µg/mL의 낮은 농도에서도 LPS 단독처리구와 비교하였을 때 50% 이상의 뛰어난 억제효과를 보였으며, COX-2의

경우에는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 물 추출물을 처리 시에 PBS 처리구와 비슷한 발현량이 나타난 것을 확인할 수가 있었다.



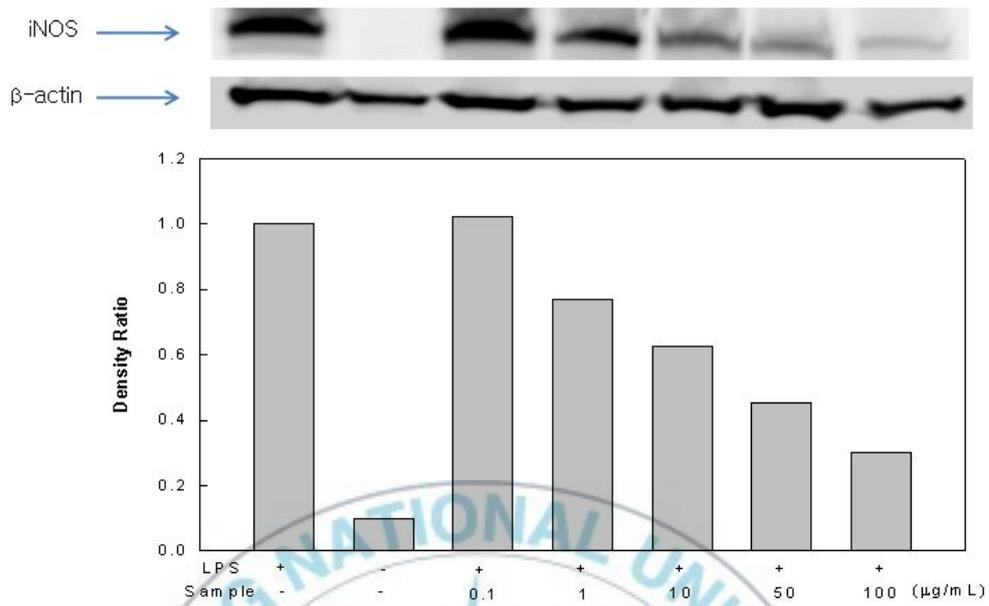


Fig. 16. Effect of *Sargassum micracanthum* ethanol extracts on LPS-induced iNOS expression in RAW 246.7 cells.

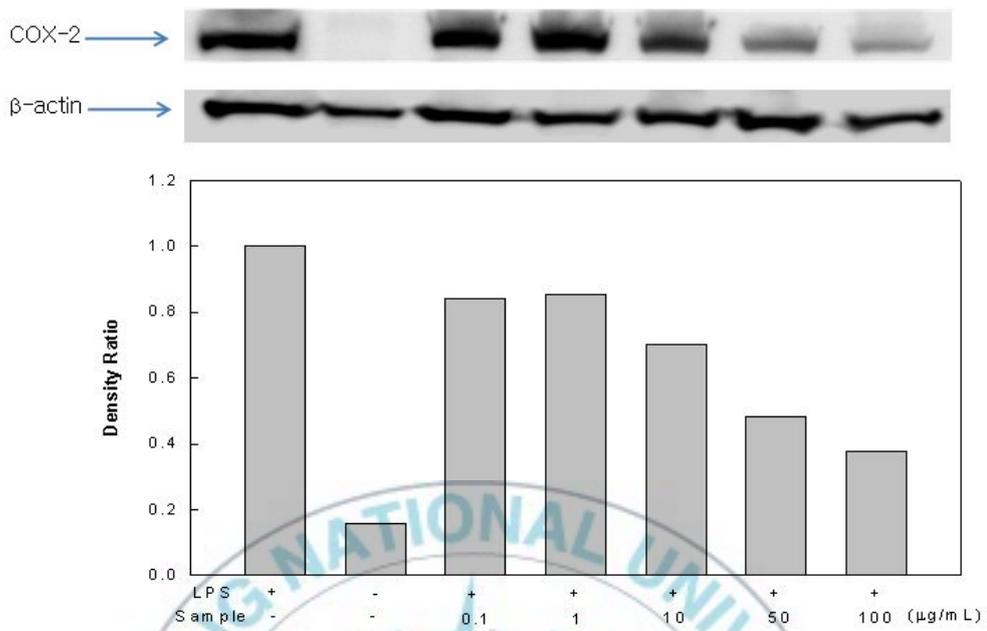


Fig. 17. Effect of *Sargassum micracanthum* ethanol extracts on LPS-induced COX-2 expression in RAW 246.7 cells.

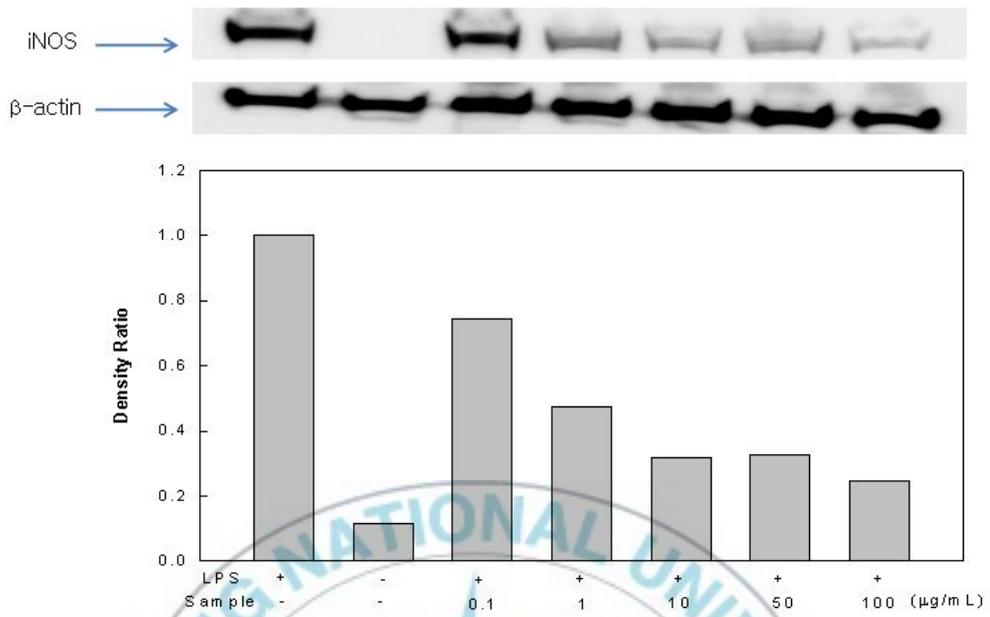


Fig. 18. Effect of *Sargassum micracanthum* water extracts on LPS-induced iNOS expression in RAW 246.7 cells.

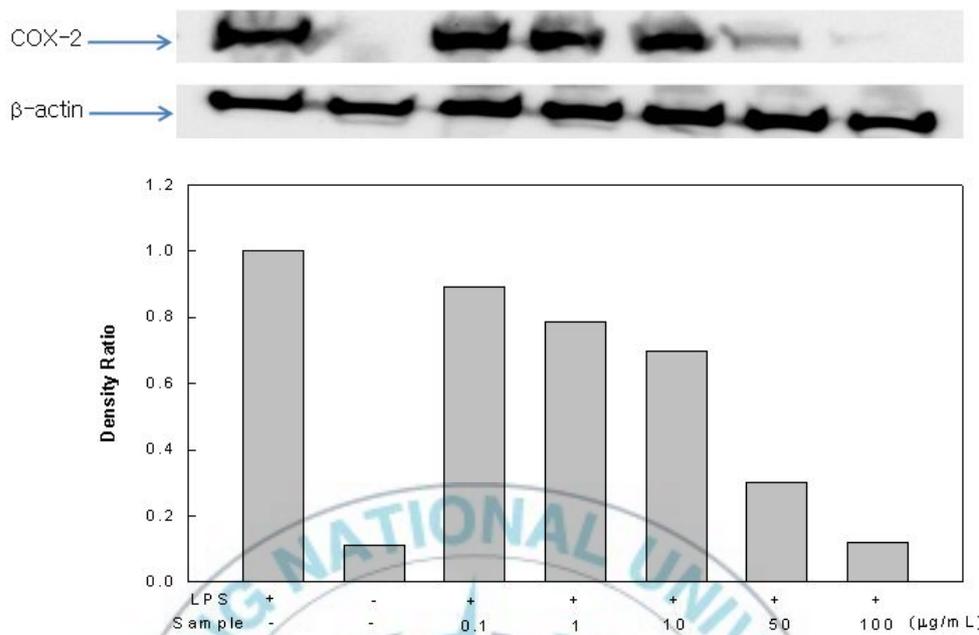


Fig. 19. Effect of *Sargassum micracanthum* water extracts on LPS-induced COX-2 expression in RAW 246.7 cells.

2-5. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

염증은 인체의 손상 및 감염 등에 대한 일차적인 보호 작용으로서, 물리화학적 요인, 면역학적 요인 등에 의해 발생하며 발적, 발열, 부종, 통증을 동반한다. 염증이 유발되면 혈류량이 증가하여 열감과 발적이 나타나고, 혈액 내의 neutrophils 등이 혈관 밖 조직으로 부과되어 부종을 유발하며 염증 부위의 prostaglandin 증가 및 cytokine 활성화를 통해 통증이 유발된다(Ju et al., 2010). 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물의 효능을 확인하기 위해 10, 50 및 250 mg/kg 농도로 200 μ L씩 경구투여 한 후, croton oil로 염증 유발하고 귀 두께를 측정하였다(Fig. 20). control과 비교하여 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소한 것을 확인하였으며, 이는 현지초의 진통 및 항염증 효과에 관한 연구(Ju et al., 2010)와 유사하다. 특히, 250 mg/kg 농도에서 positive control인 prednisolon 처리구와 비교하였을 때, prednisolon 50 mg/kg 처리보다 현저히 감소함을 확인하였다. 이는 조직 관찰 결과에서도 일치하는 경향을 나타내었다(Fig. 21,22). 통증 및 염증의 완화에는 비스테로이드계 소염진통제가 주로 사용되지만 부작용(Sanchez-Borges, 2010)이 보고된 바 있다. 따라서 현재 천연물로부터의 새로운 진통 및 항염증제의 가능성을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며 본 연구의 귀 부종 억제 실험 결과로 미루어 볼 때, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물은 부종 완화에 뛰어난 효과가 있으며 이를 이용한 치료제 개발에도 가능성이 있을 것으로 사료된다.

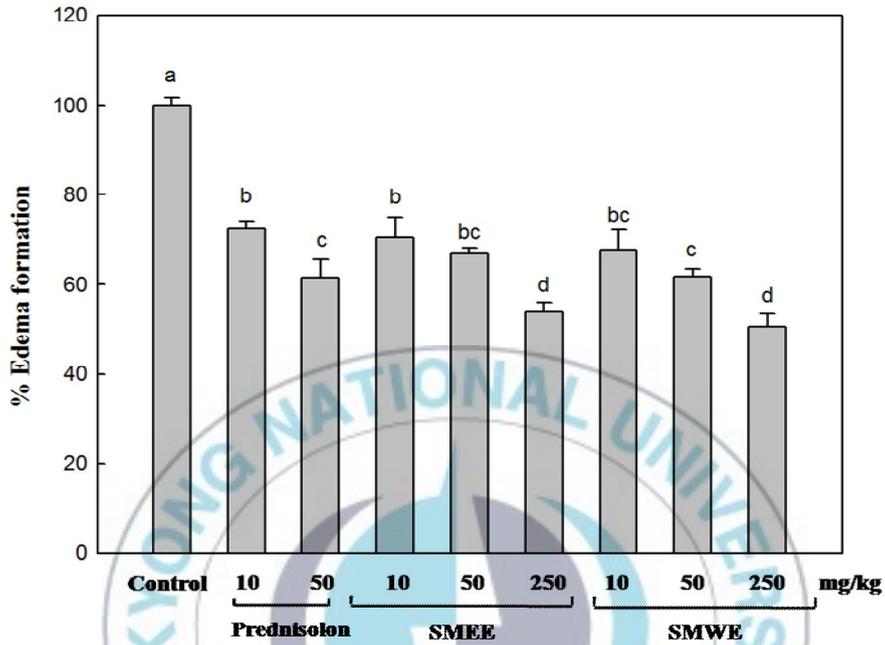


Fig. 20. Inhibition of *Sargassum micracanthum* ethanol and water extract against croton oil-induced mouse ear edema. ^{a-d} means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

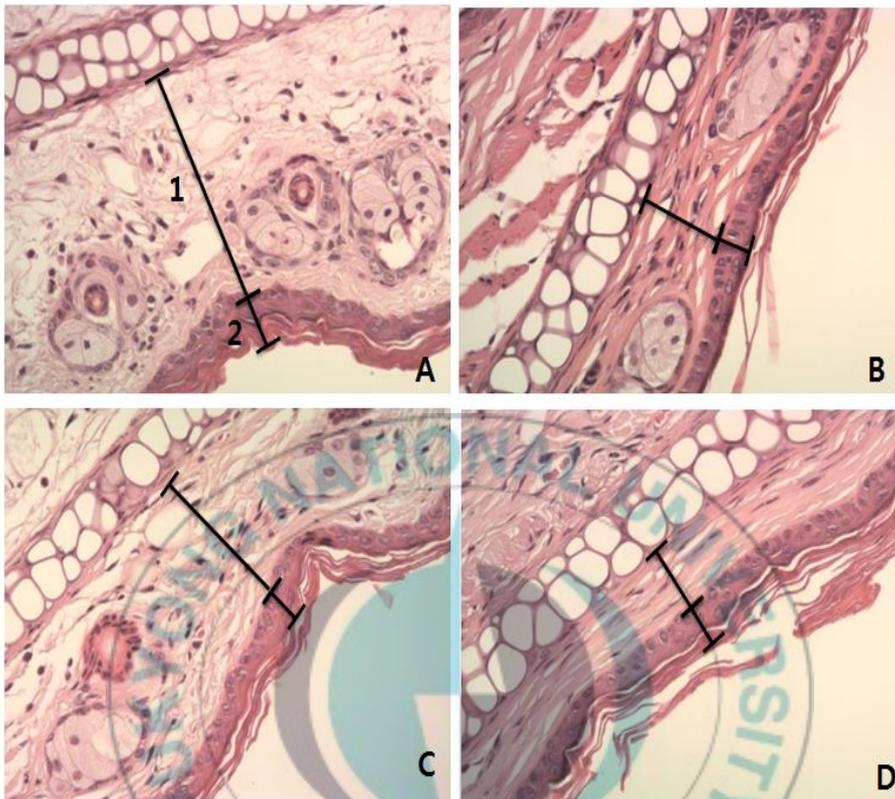


Fig. 21. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of Croton oil 5% (v/v) in acetone (A–C) or vehicle acetone (D, non-inflamed), stained with hematoxylin–eosin and examined under light microscopy (magnification: 200×). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (A), prednisolone 0.08 mg/ear (B) and *Sargassum micracanthum* ethanol extract 20 µL/ear (C). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively.

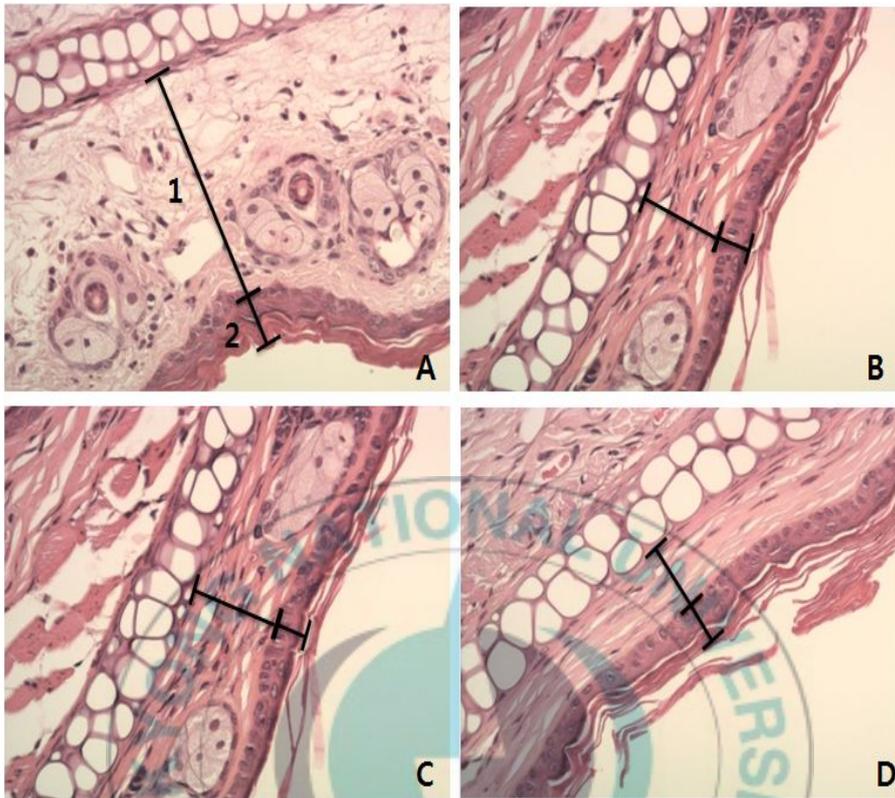


Fig. 22. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of Croton oil 5% (v/v) in acetone (A-C) or vehicle acetone (D, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin and examined under light microscopy (magnification: 200×). Treatments: vehicle 2% Tween 80 (A), prednisolone 0.08 mg/ear (B) and *Sargassum micracanthum* water extract 20 µL/ear (C). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively.

2-6. 단기 독성 평가

천연 식물은 예로부터 여러 가지 민간요법으로 사용 또는 섭취가 되어오면서 효능이 검증 되어왔고, 최근에 와서 현대의학의 대체 요법으로 사용이 되고 있다. 선진국에서는 이미 전 세계 자원식물에 대한 치료 또는 예방 기능과 경제적 효용 가치를 평가하여 보다 다양한 식품종의 확보에 주력하고 있다(KHIDI, 2006). 본 연구에서는 해양 식물 자원인 잔가시 모자반의 에탄올 및 물 추출물의 독성을 평가하기 위해 300, 2000 및 5000 mg/kg 농도로 200 μ L씩 경구투여하고 2주간 행동변화 및 치사율을 관찰하였다(Table 2). 경구투여 후 4시간까지 행동 변화를 관찰하였을 때, 에탄올 추출물의 5000 mg/kg 농도 처리구에서 1개체에서 30분 정도 수면 상태를 보였으나 2시간 이후 회복하였다. 이러한 행동은 투여 직후에 일시적으로 관찰되었으며 이외의 일반 증상이나 사망 증상이 나타나지 않았기 때문에 잔가시 모자반 에탄올 추출물 투여에 의한 독성 현상은 아닌 것으로 사료된다. 이러한 결과는 생강나무 에탄올 추출물에 대한 독성 평가 결과(Hong et al., 2009)와 유사하다. 반면에 물 추출물에 있어서는 모든 농도에서 이상 행동은 관찰되지 않았다. 또한 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 투여한 후 2주 동안 이틀 간격으로 관찰한 결과, 그 치사율은 0%로 나타났다. 이러한 결과를 종합 해 볼 때, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물은 5000 mg/kg 농도에서도 인체에도 무해하며 안전한 소재로서 식재료 또는 건강 기능 식품의 원료로서도 사용이 가능하다고 볼 수 있을 것이다. 또한 기존의 밝혀진 잔가시 모자반의 생리활성과 함께 항염증 기능성 식품 소재로 무한한 이용과 가공이 가능할 것으로

사료된다.



Table 2. Mortality of mice treated orally with *Sargassum micracanthum* ethanol and water extracts

		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	SMEE	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	SMWE	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg·body weight	SMEE	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	SMWE	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5000 mg/kg·body weight	SMEE	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	SMWE	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

요 약

참치안구유, 잔가시 에탄올 및 물 추출물의 항염증 활성을 알아보기 위해 LPS 처리한 RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성억제를 관찰하고, iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 단백질 발현정도를 알아보았다. 또한 동물실험을 통하여 귀 부종 억제 및 조직 변화를 확인하였으며 단기 독성 평가를 실시하였다.

1. 세포 증식능

참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL의 농도로 첨가하여 배양한 결과, 모든 첨가 농도에서 RAW 264.7 세포 증식능이 무첨가구에 비해 유의적으로 증가함에 따라 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

2. Nitric Oxide 생성량

참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물에 의한 NO 생성량이 LPS 처리구 보다 유의적으로 감소함을 확인하였으며, 특히 잔가시 모자반 에탄올 추출물 처리의 경우 0.1 μ g/mL으로 처리하였을 때, 추출물을 처리하지 않은 군과 비교하여 약 50% 이상의 NO 생성 감소 효과를 확인하였다.

3. Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

3-1. IL-6 분비량

참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 처리하였을 경우, 모든 농도 처리구에서 IL-6의 생성이 감소되었으며, 참치안구유, 잔가시 에탄올 및 물 추출물 50 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 77, 49 및 35% 이상 그 분비량이 감소되었다.

3-2. TNF- α 분비량

참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물에 의한 TNF- α 분비량은 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히, 참치안구유를 낮은 농도인 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 으로 처리하였을 때, 58% 이상의 높은 감소를 보여 TNF- α 분비 억제에 뛰어난 효과가 있음을 나타내었다.

3-3. IL-1 β 분비량

참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물에 의한 IL-1 β 분비량은 농도에 따라 유의적으로 감소하였다. 참치안구유를 50 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였을 때 약 50% 이상 높은 분비량 감소를 보였으며 특히, 잔가시 모자반 에탄올 추출물을 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 경우, 약 74% 이상의 감소효과를 보였으며 LPS와 추출물 모두 처리하지 않은 대조군과 유사한 분비량을 보여 높은 IL-1 β 분비 억제 활성을 나타내었다.

4. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과

참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 0.1-100 $\mu\text{g/mL}$

농도로 처리한 후 iNOS, COX-2 발현량을 측정하였다. 참치안구유, 잔가시 모자반 추출물 모두 농도의존적으로 단백질의 발현량이 감소하였으며, 참치안구유의 경우 50 µg/mL 농도에서 iNOS 및 COX-2의 발현량이 약 50% 이상 억제되는 것을 확인하였다.

5. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물을 경구 투여하여 귀 부종 억제 효과를 측정한 결과, control과 비교 시 유의적으로 감소함을 확인하였으며 prednisolon 50 mg/kg 농도와 유사한 억제 효과를 나타내었다. 특히, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물 투여에 있어서 250 mg/kg 농도로 투여하였을 때, prednisolon 50 mg/kg 보다 더 효과적임을 확인하였다. 또한 조직 관찰에서도 추출물을 처리하였을 때 표피, 진피의 두께가 효과적으로 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

6. 단기 독성 평가

참치안구유, 잔가시 모자반 에탄올 및 물 추출물의 독성을 알아보기 위해, 마우스를 이용하여 2주간 단기 독성 평가를 실시하였다. 그 결과, 세 시료 모두 치사율은 0%였으며 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

참 고 문 헌

Bae, S. J. 2004. Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Chondria crassicaulis*. *J Life Sci.* 14: 420-426.

Baek, Y. M., Choi, J. Y., Lee, C. W., Jeon, Y. S., Han, J. T., Jang, S. I., Yoo, H. S. 2012. Effects of *Chinemys reevesii* on lipopolysaccharide-induced inflammatory reactions. *Korean J Orinetal Physiology & Pathology.* 26: 26-34.

Beutler, B., Cerami, A. 1989. The biology of cachectin / TNF- α a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7: 625-655.

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.

Castillo, M., Amalik, F., Linares, A., Garcia-Pcregrin, E. 2000. Fish oil reduces cholesterol and arachidonic acid levels in plasma and lipoproteins from hypercholesterolemic chicks. *Mol Cell Biochem.* 210: 121-130.

Cha, S. H., Kim, Y. K. 2008. Analysis of consumption values of a seaweed functional food. *Korean J Food Culture*. 23: 462-468.

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 Koeran Soc Food Sci Nutr* 36: 269-375.

Cho, E. K., Choi, Y. J. 2010. Physiological activities of hot water extracts from *Ecklonia cava* Kjellman. *J Life Sci*. 20: 1675-1682.

Choi, H. S., Kim, H. S., Min, K. R., Kim Y. S., Lim, H. K., Chang, Y. K., Chung, M. W. 2000. Anti-inflammatory effects of fangchinoline and tetrandrine. *J Ethnopharmacol*. 69: 173-179.

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, J., Kim, J. H., Lee, J. W. 2011. Physiological properties of

tuna cooking drips hydrolysate prepared with gamma irradiation. *Process Biochem.* 46: 1875-1878.

Choi, S. K., Choi, H. S. 2004. Purification and characterization of and anticoagulant from corn silk. *J Korean soc Food Sci Nutr.* 33: 1262-1267.

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

Din, J. N., Newby, D. E., Flapan, A. D. 2004. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *BMJ.* 328: 30-35.

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.

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.

Emily, R. G., Huang, S., Charles, N. S., Dipak, P. 2011. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators.* 96: 27-36.

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.

Ham, Y. M., Kim, K. N., Lee, W. J., Lee, N. H., Hyun, C. G. 2010. Chemical constituents from *Sargassum micracanthum* and actioxidant activity. *Inter J Pharmacol.* 6: 147-151.

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 oriental physiology &*

pathology. 22: 810-814.

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

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 RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 48: 2045-2051.

Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanism of activated macrophages. tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanism acts synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol*. 144: 1425-1431.

Hilliquin, P., Borderie, D., Hervann, A., Menkes, C. J., ekindjian, O. G. 1997. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 40: 1512-1517.

Hong, C. O., Seo, M. Y., Koo, Y. C., Nam, M. H., Lee, H. A., Kim, J. H., Wang, Z., Yang, S. Y., Lee, S. H., No, S. H., Lee, K.

W. 2009. Single and 14-day repeated oral toxicity studies of 70% ethanol extract of *Lindera Obtusiloba* blume leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 38: 1324-1330.

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

Imm, J. Y., Kim, S.J. 2010. Anti-cancer and ant-inflammatory effects of mung bean and soybean extract. *Korean J Food Sci Technol* 42: 755-761.

Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., Kim S. K. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzyme hydrolysis. *Process Biochem.* 42: 840-846.

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.

Joo, D. S., Lee, J. K., Choi, Y. S., Cho, S. Y., Je, Y. K., Choi, J. W. 2003. Effect of sea tangle oligosaccharide drink on serum and hepatic lipids in rats fed a hyperlipidemic diet. *J Korean*

Soc Food Sci Nutr. 32: 364-369.

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, W. K., Ahn, Y. W., Lee, S. H., Choi, Y. H., Kim, S. K. Yea, S. S., Choi, I. H., Park, S. G., Seo, S. K., Lee, S. W., Choi, I. W. 2009. *Ecklinia cava* ethanolic extracts inhibit lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in BV2 microglia via the MAP kinase and NF- κ B pathways. *Food Chem Tox* 47: 410-417.

Kang, H., Kwon, H. A., So, H. J., Lee, J. M., Lew, J. H., Choi, H. Y. 2012. Effect of *Samhwangsashimatang* extract on lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response and macrophage activity. *Kor J Herbology.* 27: 23-28.

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 *Dietyota coriacea* extracts derived from adjacent sea of the jeju island. *Koran J Biotechnol Bioeng.* 23: 32-36.

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

Kim, C., Lee, I. K., Cho, G. Y., Oh, K. H., Lim, Y. W., Yun, B. S. 2012. Sargassumol, a novel antioxidant from the brown alga *Sargassum micracanthum*. *J antibiotics*. 65: 87-89.

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. H., Hwang, E. Y., Son, J. H. 2013. Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorious* seed extracts in RAW 264.7 cells. *J Life Sci*. 23: 55-62.

Kim, H. J., Park, T. S., Jung, M. S., Son, J. H. 2011. 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, M. J. Anti-inflammatory activity of the *Sargassum fulvellum* and *Sargassum sagamianum* ethanol extracts. 2012. Pukyong national university MS thesis. 25-28.

Kim, N. Y., Kim, H. J., Lee, J. H., Lee, E. K., Kang, O. H., Kwon, D. Y., So, H. S., Lee, K. N., Chong, M. S. 2011. Comparison of the anti-inflammatory effects of water fermented and ethanol fermented extracts Rhei Radix et Rhizoma. *Korean J oriental physiology & pathology*. 25: 227-233.

Kim, R. G., Shin, K. M., Chun, S. K., Ji, S. Y., Seo, S. H., Park, H. J., Choi, J. W., Lee, K. T. 2002. *In vitro* anti-inflammatory 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. 2011. Anti-inflammatory activity of *Camellia japonica* oil. *BMB reports*. p. 177-182.

Kim, Y. J., Kim, H. J., No, J. K., Chung, H. Y., Fernandes, G. 2006. Anti-inflammatory action of dietary fish oil and calorie restriction. *Life Sci*. 78: 2523-2532.

Kim, Y., Jung, K. S., Jeong, H. G. 2004. Suppressive effects of the dahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* 569: 321-326.

Kim, Y. S., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, E. H., Park, P. J., Jeong J. H. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 41: 1205-1210.

Kim, Y. W., Park, D. H. 2008. The study on antimicrobial and antifungal activity of the wild seaweeds of jeju island. *J Soc Cosmet Sci Korean.* 34: 201-207.

Ko, E. M., Kim, B. Y. 2004. Antimicrobial activity of ϵ -polylysine mixtures against food-borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 33: 705-710.

Korea Health Industry Development Institute (KHIDI). 2006. The tendency of research and development of internal and external natural source remedies. The second: plan for promotion of natural medicine research & development. p 1-20.

Ko, S. B., Hyun, C. S., Kang K. W. 2011. A study on setting the

direction of development for the functional and mixed drinks using the jeju water. *J Korean Academia-Industrial Cooperation Soc.* 12: 2133-2141.

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

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, C. J. Inhibitory effects of *Sargassum horneri* extracts on atopic disease. 2010. Pukyong national university MS thesis. 18-39.

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, E. S., Ku, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Ahng, Y., Lee, S. H., Son, K., Baek, S. H., Chang, H. W. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Bio. Pharm Bull.* 27: 617-620.

Lee, H. J. 2011. Anti-inflammatory effect of Chungseoikgitang ethananol extract on allergic-inflammatory reaction. Wonkwang university DS thesis 1-20.

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

Lee, H. N., Lim, D. Y., Lim, S. S., Kim, J. D., Yoon, J. H. 2011. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Eupatorium japonicum*. *Korean J Food Sci Technol* 43: 65-71.

Lee, K. H., Nam, H. O., Yoon, W. H. 2007. Effect of

protein-bond polysaccharide isolated from *Acanthopanax senthoptanax* 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. T., Jeong, Y. R., Ha, M. H., Kim, S. H., Byun, M. W. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.

Lee, T. H., Kwak, H. B., Kim, H. H., Lee, Z. H. Chung, D. K., Baek, N. I., Kim, A. 2007. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-kappa B

transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells*. 23: 398-404.

Lee, Y. J., Yoon, B. R., Choi, H. S., Lee, B. Y., Lee, O. H. 2012. Effect of *Sargassum micracanthum* extract on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J Food Preserv*. 19: 455-461.

Leite, G. O., Leite, L. H. I., Sampaio, R. S., Araruna, M. K. A., Rodrigues, F. F. G., Menezes, I. R. A., Costa, J. G. M., Campos, A. R. 2011. Modulation of topical inflammation and visceral nociception by *Vanillosmopsis arborea* essential oil in mice. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 1: 216-222.

Li, Y. X., Wijesekara, I. L., Y., Kim, S. K. 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Pro Bio* 46: 2219-2224.

Lim, H. R., Shin, S. W. 2010. Effects of the essential oil components from *Ligusticum chuanxiong* on proinflammatory mediators of RAW 264.7 macrophage cells. *Korean Sci Pharm*. 16: 259-264.

Lim, J. H., Jung, K. S., Lee, J. S., Jung, E. S., Kim, D. K., Kim, Y. S., Kim, Y. W., Park, D. H. 2008. The study on antimicrobial and antifungal activity of the wild seaweeds of jeju islnad. *J Soc Cosmet Sci Korean*. 34: 201-207

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 Gastroenterol*. 12: 3386-3392.

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: 823821.

Makins, R., Ballinger, A. 2003. Gastrointestinal side effects of drugs. *Exper Opin Drug Saf*. 2: 421.429.

Mathiak, G., Grass, G., Herzmann, T., Luebke, T. 2000.

Capase-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.

Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43: 109-142.

Oh, J. K., Shin, T. O., Sohn, H. S., Seo, R. M. 2003. Effect of functional food including seaweeds extracts supplementation on hematological variables and antioxidant system. *Korean J Physic Edu.* 42: 895-903.

Park, J. H., Kim, S. Y., Kang, M. G., Yoon, M. S., Lee, Y. I., Park, E. J. 2012. Antioxidant activity and safety evaluation of juice containing *Protaetis brevitaris*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 41: 14-48.

Posadas, I., Terencio, M. C., Guillen, I., Ferrandiz, M. L.,

Coloma, J., Paya, M. 2000. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 361: 98-106.

Roh, H. S., Youn, H. S., Jung, S. M., Hong, Y. R., Kang, K. Y., Chun, B. S. 2005. Separation of volatile compounds from tuna fish oil with supercritical carbon dioxide. *Koran J Biotechnol Bioeng.* 20: 12-17.

Ryu, B. R., L, Y., Qian, Z. J., Kim, M. M., Kim, S. K. 2009. Differentiation of humna osteosarcoma cells by isolated phlorotannins in subtly linked to COX-2, iNOS, MMPs, and MAPK signaling: implication for chronic articular disease. *Chem. Bio Int* 179: 192-201.

Sanchez-Borges, M. 2010. NSAID Hypersensitivity (Respiratory, Cutaneous, and Generalized Anaphylactic Symptoms). *Medical clinics of north america.* 94: 853-864.

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.

Rogério, A. S., Mariana K. A. A., Romagna, C. O., Kleber, D. P., Menezes, G. O. L., Marta, R. K., Jose, G. M. C., Joao, B. T. R., Adriana, R. T., Adriana, R. C., Irwin, R. A. M. 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.

Simopoulos, A. P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr.* 54: 438-463.

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

Sung, T. T., Kim, S. D., Yang, W. K., Nho, K. J., Seo, H. S., Kim, Y. S. 2012. Inhibitory effects of *Drynaria fortunei* extracts on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis in NC/Nga

mice. *J Ethnopharmacol* 2012 [in press].

Swamy, M. V., Citineni, B., Patlolla, J. M. R., Mohammed, A., Zhang, Y., Rao, C. V. 2008. Prevention and treatment of pancreatic cancer by curcumin in combination with omega-3 fatty acids. *Nutr Cancer*. 60: 81-89.

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 bugeanum. *J Ethnopharmacol*. 77: 209-217.

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 transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.

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.

Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T., Huea, G. 1996. Tumor necrosis factor- α production induced by viruses and by lipopolysaccharide in macrophages. similarities and differences. *J Immunol.* 46: 1-12.

Yoo, S. R., Jeong, S. J., Kim, Y. J., Lim, H. S., Jin, S. E., Jeon, W. Y., Shin, I. S., Shin, N. R., Kim, S. S., Kim, J. H., Ha, H. K., Lee, M. Y., Kim, O. S., Seo, C. S., Shin, H. K. 2012. Effects of water and ethanol extracts from *Ojeok-san* on inflammation and its related diseases. *Korean J Orient Int Med.* 33: 418-428.

Yoon, J. A., Yu, K. W., Jun, W. J., Cho, H. Y., Son, Y. S., Yang, H. C. 2000. Screening of anticoagulant activity in the extracts of edible seaweeds and optimization of extraction condition. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 29: 1098-1106.

Yoon, W. J., Ham, Y. M., Kim, S. S., Yoo, B. S., Moon, J. Y. Baik, J. S., See, N. H., Hyun, C. G. 2009. Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression by

brown algae *Sargassum micracanthum* RAW264.7 macrophages. *Eurasia J Biosic* 3: 130-143.

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

Yun, Y. G., Kim, G. M., Lee, S.J., Ryu S.H., Jang, S. I. 2007. Inhibitory effect of aqueous extract from *Lonicera japonica* flower on LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages. *Kor J Herbology* 22: 117-125.



감 사 의 글

먼저 석사 과정 동안 부족한 저를 위해서 아낌없는 격려와 지도를 해주시고 인생의 길잡이가 되어주신 지도교수 안동현 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 저의 논문 심사를 맡아주신 조영제 교수님, 전병수 교수님께도 감사드리며 아울러 언제나 학문적 격려와 충고를 아끼지 않으신 김선봉 교수님, 이양봉 교수님, 양지영 교수님, 김영목 교수님께도 깊은 감사의 마음을 전합니다.

저의 대학원 생활에 있어서 너무 많은 소중한 분들이 있었기에 지금 이 자리에 설 수 있었던 것 같습니다. 학부 때부터 석사 생활을 마무리 할 때까지 부족한 점이 많은 저에게 진심어린 충고와 도움을 주신 꽃봉 언니께 감사의 마음을 전하며 제가 논문을 마무리하기 까지 여러 방면으로 많은 도움을 준 민지언니를 비롯하여 졸업하신 모든 선배님들께 감사드립니다. 또한 늘 열심히 생활하고 있는 모든 후배님들께도 감사의 마음을 전합니다.

오랜 시간 동안을 바쁘고 힘들다는 핑계로 연락조차 제대로 못했지만 항상 격려해주고 힘이 되어준 나의 소중한 친구들 시현, 은혜, 지선이에게 사랑과 고마움을 전합니다.

마지막이지만 항상 첫 번째인, 억만금을 쥐도 바꿀 수 없는 소중한 우리 가족, 제 뒤에서 언제나 버팀목이 되어주시며 늘 응원해주시는 아빠와 엄마, 하나뿐인 동생 정다원 모두 사랑합니다. 또한 저를 너무 예뻐 해 주시는 할아버지, 하늘에서 저를 응원해주실 할머니, 큰아빠, 이모, 이모부, 삼촌, 숙모, 사촌오빠들과 동생들까지 항상 감사드리고 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다.

석사 과정에서의 소중한 경험들을 바탕으로 항상 최선을 다하고 믿음직스러운 사람이 되겠습니다. 지면으로 통해서 일일이 언급을 하지 못했지만 그 동안 저를 아끼고 사랑해주신 모든 분들께 다시 한 번 진심으로 감사드립니다.