



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

모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 항염증 효과



2012年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

金 民 芝

工學碩士 學位論文

모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 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



2012年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

金 民 芝

金民芝의 工學碩士 學位論文으로 認准함

2012年 2月



주	심	수산학박사	조 영 제	㉠
---	---	-------	-------	---

위	원	공학박사	전 병 수	㉠
---	---	------	-------	---

위	원	농학박사	안 동 현	㉠
---	---	------	-------	---

목 차

Abstract	III
----------------	-----

서 론	1
-----------	---

재료 및 방법

1. 실험재료	
1-1. 원료	6
1-2. 시약	6
2. 추 출	7
3. 방 법	
3-1. 세포배양	7
3-2. 세포독성 측정	8
3-3. Nitric Oxide 생성량 측정	8
3-4. Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정	9
3-5. COX-2 발현량 측정	10
4. 통계처리	11

결과 및 고찰

1. 세포 증식능	12
2. Nitric oxide 생성량	15
3. Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과	

3-1. TNF- α 분비량	19
3-2. IL-6 분비량	23
3-3. IL-1 β 분비량	27
4. COX-2 단백질 발현 억제 효과	31
 요 약	 34
 참 고 문 헌	 36



Anti-inflammatory Activity of the
Sargassum fulvellum and *Sargassum sagamianum*
Ethanol Extracts

Min-Ji Kim

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

Abstract

Inflammation is a beneficial host response to external stimuli or cellular damage that leads to the release of a complex array of inflammatory mediators, finalizing the restoration of the tissue structure and function. However, prolonged inflammation contributes to the pathogenesis of various inflammatory diseases. The macrophage is a potent cell which plays a critical role in the inflammatory reaction and influences between innate and adaptive immunity. It produces many kinds of mediators including nitric oxide(NO), prostaglandins, pro-inflammatory and cytotoxic cytokines such as interleukin-1 beta(IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor-alpha(TNF- α). Currently, 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, the anti-inflammatory effects of *Sargassum fulvellum*(SFEE) and *Sargassum sagamianum*(SSEE) ethanol extracts were investigated using LPS-induced inflammatory response in this study. To examine the potential anti-inflammatory properties of SFEE and SSEE, the cell proliferation, NO, TNF- α , IL-6 and IL-1 β were measured. The expression of COX-2 was also assessed by immunoblotting to evaluate the inhibitory actions of SFEE and SSEE on prostaglandins. As a result, 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 TNF- α , IL-1 β and IL-6 were suppressed in a dose-dependent manner, and IL-6 and IL-1 β inhibition activities were over 50% at 0.1 μ g/mL. The expression of COX-2 was also inhibited by SFEE and SSEE which demonstrate strong anti-inflammatory effect through its ability to reduce prostaglandin.

These results suggested that SFEE and SSEE may have significant effects on inflammatory factors and be a potential anti-inflammatory therapeutic materials.

서 론

최근 경제성장의 발전과 더불어 평균수명의 연장과 함께 고령자 인구의 비율도 날로 증가하고 있는 추세이다. 또한 풍요로운 식생활은 수산물이나 야채 등과 같은 식품 소재를 주로 이용하던 전형적인 우리나라 식문화를 변화시켜 암, 당뇨병, 고혈압, 비만 및 혈관성 질환 등의 생활습관 병이 차지하는 비율이 매년 증가하고 있다. 이와 더불어, 면역 조절 이상으로 인하여 유발된 염증이 지속됨으로써 발생하는 염증성 질환의 발병률 또한 최근 10년 사이에 서양에서 뿐만 아니라 한국에서도 급증하고 있는 실정이다(Chang et al., 1994; Song et al., 1998).

염증반응은 체내에 기질적 변화를 가져오는 화학적 물질, 세균 감염 및 물리적 작용에 의해 발생된 손상 부위를 재생하려는 기전이다. 유해한 자극, 감염 및 외상 등에 의해 염증이 발현되면 국소적으로 염증성 성분과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 염증을 유발하는데, 이와 같은 염증반응이 지속되면 오히려 점막손상을 촉진함에 따라 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 여러 질환을 발생시키는 원인이 된다(Tizard et al., 2004). 대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 대하여 항상성 유지에 관여하며, 염증 반응 시에는 nitric oxide(NO) 및 다양한 cytokine을 생산하여 감염 초기에 생체방어에 중요한 역할을 하는 세포이다(Higuchi et al., 1990). RAW 264.7과 같은 대식세포 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). COX는 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 prostaglandin으로의 변화를 촉진시키는 효소로서 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). Nitric oxide(NO)는 세포 내에서 L-arginine을 기질로 하여 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-citruline과 함께 생성되는 신경계, 면역계, 심장혈관계에서 주요 전달 물질로 신경독성 및 신경 보호성의 기능을 동시에 나타내고, 쇼크 및 여러 가지 신경 퇴행성 질병의 발생에도 관여하는 것으로 보고되고 있다(Bredt et al., 1994; Jaffrey et al., 1995). NOS는 세포의 종류에 따라 신경성 NOS(nNOS, NOS1), 유도성 NOS(iNOS, NOS2), 내피성 NOS(eNOS, NOS3)로 분류되며(Tsao et al., 2002), 이중 유도성 iNOS는 세포내

칼슘 농도와 외부에서 주입된 calmodulin의 자극과는 무관하게 활성화된 세포에서만 활성을 보이며 다양한 세포에서 유도된다(Lowenstein et al., 1993; Vodovotz et al., 1995). 또한, 활성화된 Nuclear transcription factor-kappa B(NF- κ B)는 TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS 및 COX-2 등의 여러 염증 매개 물질의 전사를 촉진하는 전사인자로서 이들의 유전자 발현에 크게 영향을 미친다(Straus et al, 2000).

따라서 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. 특히, 천연물로부터 분리, 정제된 물질은 비교적 독성이 적어 의약품에 비해 장기간 섭취하여도 안전하다는 면 때문에 각종 염증성 질환의 치료제 및 치료보조제로서 각광받고 있다. 현재 천연물을 이용한 염증반응 완화에 대한 연구로는 삼백초(Chen et al., 2003), 오가피(Lee et al., 2007), 홍화(Kawashima et al., 1998), 금은화(Yun et al., 2007) 등 생약재의 항염증에 관한 연구들과 등골나물(Lee et al., 2011), 큰비쭉(Yoon et al., 2007), 녹두 및 대두(Imm et al., 2010) 등의 육상식물에 대한 연구들이 주를 이루고 있다.

해조류는 식물성 플랑크톤과 함께 해양 생태계의 일차생산자로서 다양한 해양생물의 산란장, 은신처 및 성육장의 역할을 하고 있으며 동양에서는 기원전 300-800년, 서양에서는 1,400년 전부터 식용과 약재로 사용되어온 주요한 해양생물자원의 하나이다(Inderggaard et al., 1991; Waaland, 1981). 우리나라 해조류 중에서 총 54종(녹조류 16

중, 갈조류 17종, 홍조류 21종)이 약용종으로 알려져 있으며, 청각(*Codium fragile*)과 지층이(*Sargassum thunbergii*)는 식품으로 이용되면서 해충을 제거하는 효과가 있고, 미역(*Undaria pinnatifida*)은 자궁 수축 및 출산 후 손실된 혈액 보충을 위한 식용으로 사용되었다(Oh et al., 1990). 최근, 갈조류인 미역, 다시마, 감태 등의 열수 추출물에서 항혈액응고 활성 물질이 확인되었고(Kim et al., 2004), 새빨간검둥이(*Neorhodomela aculeata*)와 모란갈파래(*Ulva conglobata*)의 추출물은 항균, 항염증 및 항산화 효능을 보였다(Jin et al., 2006; Lee et al., 2006; Lim et al., 2006). 특히 갈조류에는 섬유소를 비롯하여 미네랄, 무기질, 비타민 및 단백질이 다량 함유되어 있고, 알긴산(alginic acid), 푸칸(fucan), 라미나란(laminaran) 등의 수용성 다당류가 풍부하다(Shim et al., 2003). 이들 수용성 다당류는 다량 섭취 시 인체에 무해하며, 푸칸과 알긴산 유도체들은 항염증, 항바이러스, 항종양 등의 효과가 있다고 알려져 있다(Hsueh et al., 1992). 또한, 갈조류로부터 추출한 alginic acid의 항균효과와 해조류 성분의 항산화작용 등도 보고되고 있다(Choi et al., 1992; Lee et al., 2000). 이와 더불어 갈조류인 톳(*Hizikia fusiforme*), 팽쟁이(*Sargassum horneri*) 및 잔가시 모자반(*Sargassum micracanthum*) 에탄올 추출물의 항염증 효과(Park et al., 2009; Lee, 2010; Yoon et al., 2009))가 알려져 있으며, 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. 이러한 여러 생리활성물질들을 포함하고 있음에도 불

구하고 과거에는 열량소로서의 역할을 하지 못하는 해조류의 특성 때문에 이에 대한 활발한 연구가 이루어지지 않았다. 하지만, 최근 급격히 진행되는 경제발전과 생활수준 향상으로 인해 인체에 유용한 성분들이 함유되어 있고 비교적 안전한 천연물 유래물질로서 해조류에 대한 관심이 증가하고 있다(Cui et al., 2002).

본 연구에서 사용되어진 모자반(*Sargassum fulvellum*) 및 비틀대 모자반(*Sargassum sagamianum*)은 모자반목 모자반과에 속하는 갈조류로 우리나라 인근 해역에서 쉽게 채취할 수 있는 대표적인 식용해조류이다. 모자반에 관한 연구로는 항암(Bae, 2004), 항균 및 항산화효과(Lee et al., 2000; Lee et al., 1996)에 관한 일부 연구가 수행되고 있으며, 비틀대 모자반에 관한 연구로는 항산화효과(Cho et al., 2006), 독성중금속인 Pb 및 Cr의 생체 흡착 효과(Suh et al., 1999)에 대한 연구가 보고되어져 있을 뿐, 이외에 다양한 기능성을 가지고 있는 풍부한 자원에 비해 식품분야에 적용되는 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 모자반 및 비틀대 모자반 추출물을 이용하여 LPS로 활성화 된 RAW 264.7 대식세포에서 염증 매개물질들의 생성 억제 효과를 관찰함으로써, 식품산업에서 항염증 활성을 갖는 기능성 식품으로의 가능성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 원료

본 실험에 사용한 모자반(*Sargassum fulvellum*) 및 비틀대 모자반(*Sargassum sagamianum*)은 각각 부산 청사포와 연화리에서 채취한 것으로 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후, 이를 분말화 하고 진공 포장하여 -20°C 에서 저장하며 사용하였다.

1-2. 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, COX-2, 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. 추출

분말상태의 모자반 및 비틀대 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. 추출한 상층액은 여과지로 여과하여 37℃에서 감압농축기(RE200, yamato Co., Tokyo, Japan)로 농축한 뒤 건조하였다. 건조된 시료는 -20℃에서 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℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

3-2. 세포독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell 1×10^5 cells/mL를 well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 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.

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

3-3. Nitric Oxide 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 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의

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(NaNO_2)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다(Lee et al, 2000).

3-4. Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정

세포배양액 내의 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 및 IL- 1β cytokine의 분비량을 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 및 IL- 1β 를 분주하여 4℃에서 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 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL- 1β 의 경우, biotinylated anti-mouse IL- 1β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반

응 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. COX-2 발현량 측정

배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, lysis buffer를 첨가하여 30분간 4℃에서 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 µL의 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. COX-2의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2를 사용하여 TBST 용액으로 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 감광

하였다.

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. 세포 증식능

대식세포는 선천성 면역을 담당하는 면역세포로 병원체 등으로 인한 염증 반응 시에 NO와 같은 활성산소종 및 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 감염초기 생체방어에 중요한 역할을 한다(Higuchi et al., 1990). 본 연구에서는 대식세포인 RAW 264.7 cell에 대한 모자반 및 비틀대 모자반 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 모자반 및 비틀대 모자반 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가하여 배양한 결과, 모든 처리 농도에서 RAW 264.7 세포 증식능이 무첨가구에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였으며 RAW 264.7 세포의 증식을 유도하는 것을 관찰하였다(Fig. 1, 2). 이는 모란 갈파래(*Ulva conglabata*) 추출물에 대한 세포 독성 실험 결과, 농도 의존적으로 세포증식률이 증가하는 경향을 보였으나 세포독성은 나타나지 않은 결과와 유사하다(Jin, et al., 2006). 따라서 모자반 및 비틀대 모자반 추출물이 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않으면서 세포 염증성 매개 물질의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타내었다.

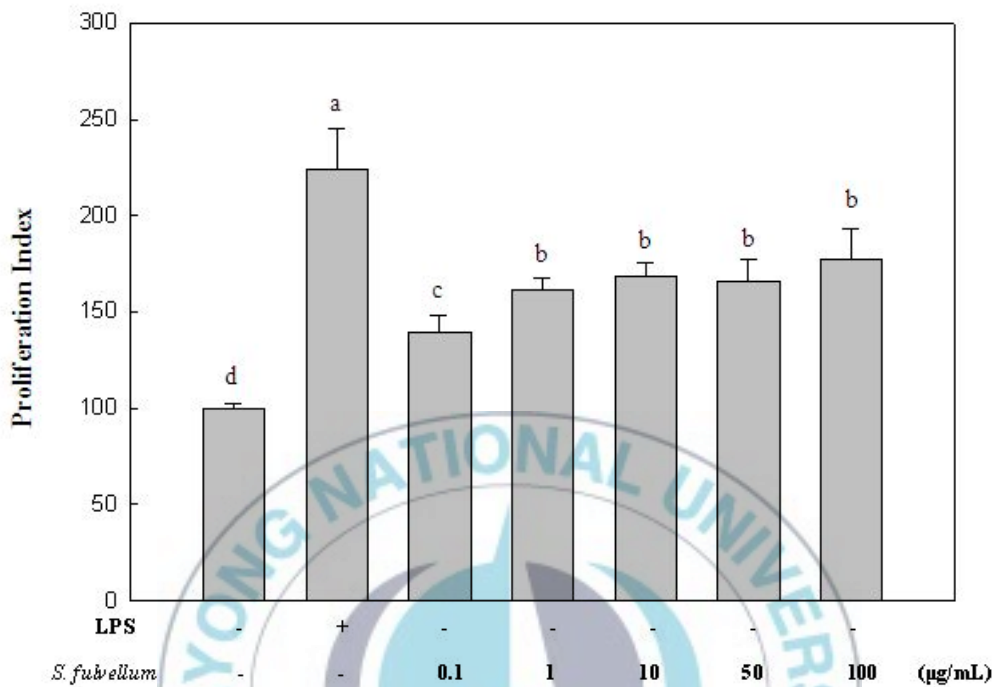


Fig. 1. Effect of *Sargassum fulvellum* ethanol extract on the proliferation of macrophage.

Proliferation index = sample O.D/control O.D*100.

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

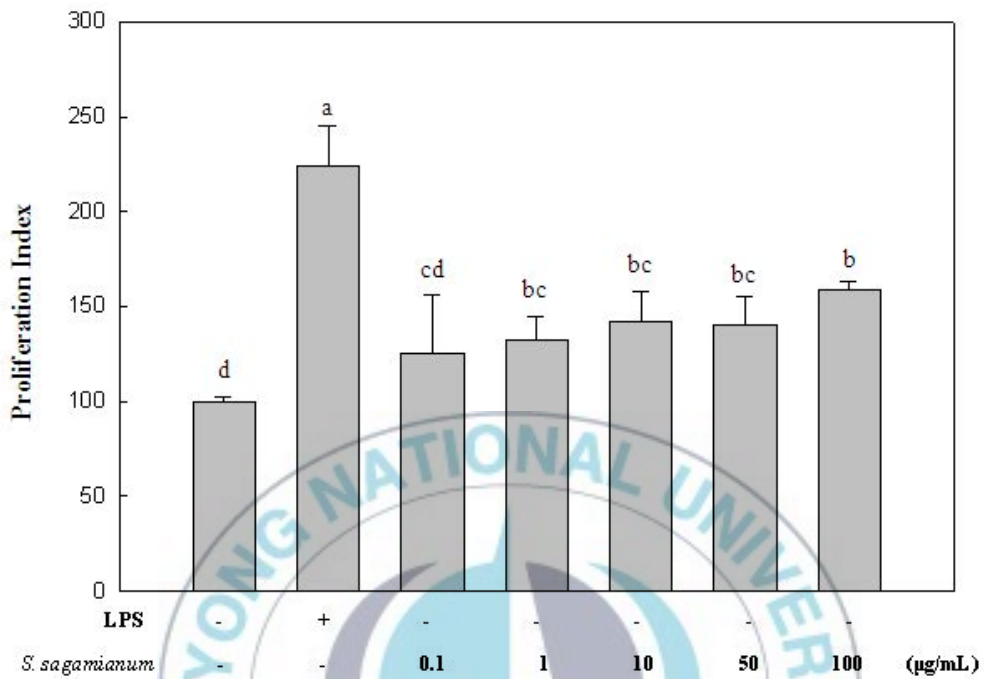


Fig. 2. Effect of *Sargassum sagamianum* ethanol extract on the proliferation of macrophage.

Proliferation index = sample O.D/control O.D*100.

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

2. Nitric Oxide 생성량

NO는 생체 내에서 NO synthase(NOS)라는 효소의 촉매 작용을 통해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유라디칼이다. 생성된 NO는 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등의 생물학적 과정에 영향을 미쳐 세포 기능유지에 중요한 작용을 하게 된다. 하지만 LPS에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 합성하게 되고, 이에 의한 세포독성으로 조직의 파괴 및 면역 체계의 이상으로 나타나는 염증 반응 및 종양발생 등에 관여하게 된다(Mori et al., 2007; Weisz et al., 1996). NO생성에 대한 모자반 및 비틀대 모자반 추출물의 효과를 알아보기 위해 RAW264.7 세포를 LPS로 활성화시킴과 동시에 모자반 및 비틀대 모자반을 각 농도별로 (0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) 첨가하고 생성된 NO 생성량을 griess 시약을 이용하여 측정하였다. LPS 처리 후 NO 생성량은 정상세포에 비해 3배 이상 증가되었으며, 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 처리하였을 경우, NO 생성량이 LPS 처리구 보다 유의적으로 감소함을 확인하였다. 특히, 모자반과 비틀대 모자반 에탄올 추출물 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도 처리에서도 현저히 낮은 NO 분비량을 보여 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 NO 생성 저해에 미치는 효과가 탁월함을 관찰하였으며, 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 각각 50 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 처리하였을 때 추출물을 처리하지 않은 군과 비교하여 약 50% 이상의 높은 NO 생성 저해능을 보임을 확인하였다 (Fig.3, 4). 이는 모자반목 모자반과에 속하는 또다른 갈조류의 하나인 팽생이 모자반(*Sargassum*

horneri) 에탄올 추출물 처리에 따라 농도 의존적으로 NO 분비량 감소를 보인 결과(Lee, 2010)와, 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*)으로부터 분리된 fucoxanthin이 높은 NO 저해능을 보인 연구결과와 유사하다(Heo et al., 2010). 대부분의 갈조류에 포함되어 있는 fucoxanthin은 carotenoid 색소에 함유 되어있는 물질로서 free radical 반응의 억제기작에 의해 발생하는 활성산소로부터 세포와 조직을 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 보고(Giovannucci, 1999) 되고 있으며, 갈조류의 대표적인 성분 중의 하나로 황을 함유하고 있는 다당류인 fucoidan 또한 RAW 264.7에서 LPS에 의한 NO의 생성과 iNOS의 발현을 억제한다는 보고(Kim, et al., 2008)에 따라 갈조류인 모자반과 비틀대 모자반의 NO 생성 저해 효과에 영향을 미친 것으로 생각된다.

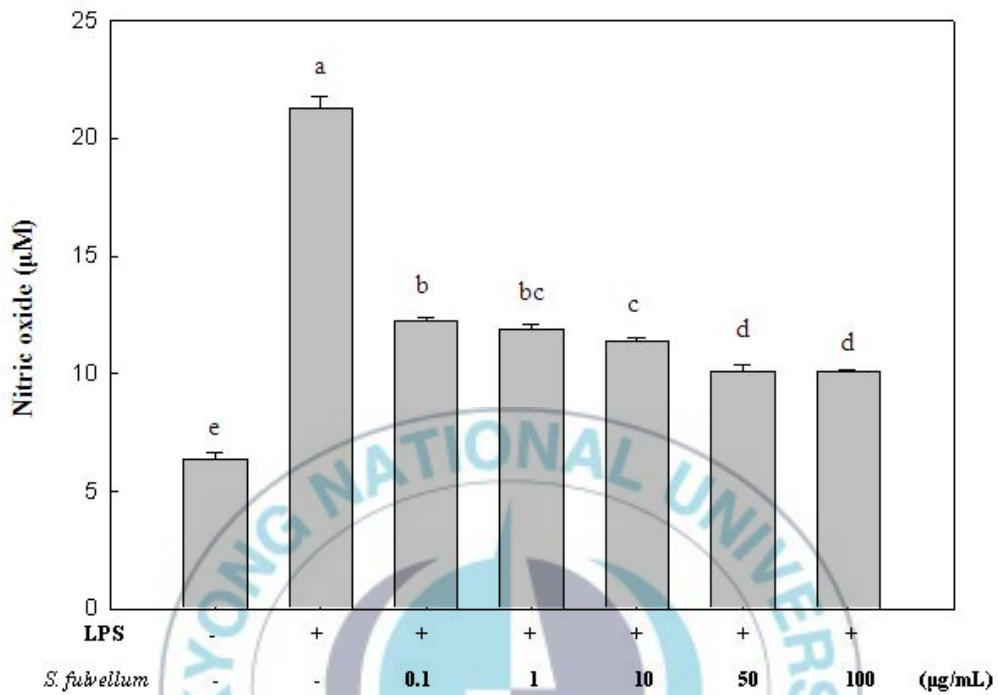


Fig. 3. Effect of *Sargassum fulvellum* ethanol extract on nitrite production in LPS-stimulated macrophage.

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

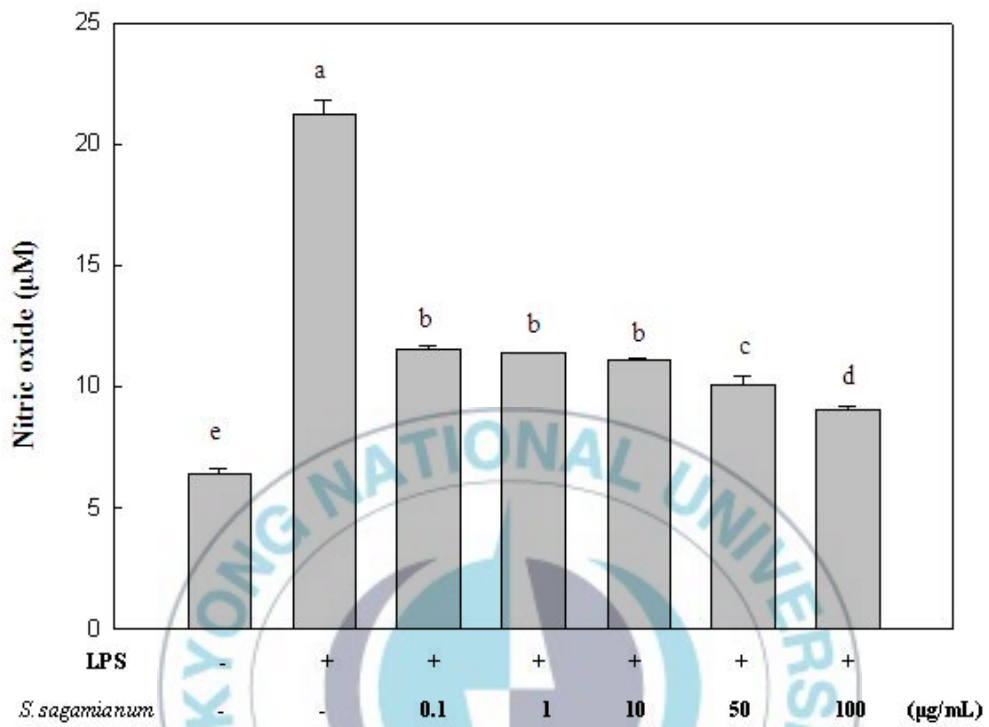


Fig. 4. Effect of *Sargassum sagamianum* ethanol extract on nitrite production in LPS-stimulated macrophage.

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

3. Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

3-1. TNF- α 분비량

종양괴사인자인 TNF- α 는 체내에서 대식세포나 림프구 등 백혈구에 의해 생성되어지는 cytokine으로 정상상태에서는 만들어지지 않으며 LPS 등에 의한 대식세포의 자극으로 합성되어 분비된다(Lin et al., 1994; Djeu et al., 1988). 또한 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 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 염증 유발 원인이 되는 주요 cytokine인 TNF- α 의 생성 억제에 미치는 영향을 알아보았다. 모자반 에탄올 추출물을 처리하였을 경우, 모든 농도 처리구에서 TNF- α 의 생성이 감소되었으며, 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 37% 이상 그 분비량이 감소됨을 확인하였다(Fig. 5). 비틀대 모자반의 경우에서도, LPS 처리 대조군에 비해 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 모든 처리구에서 TNF- α 분비량의 농도 의존적인 감소를 보였으며, 특히 50 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 낮은 분비량을 보였다(Fig. 6). 모자반과 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 TNF- α 분비량 억제 효과를 비교해 볼 때, 같은 농도에서 모자반 추출물 처리 시 보였던 TNF- α 분비량에 비해 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 처리 시 전체적으로 낮은 TNF- α 분비량을 보였다. 따라서 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 TNF- α 생성 억제에 보다 더 효과적임을 확인하

였다. 이는 토종 복분자와 외래종 복분자 에탄올 추출물의 TNF- α 생성 억제 효과에서 토종 복분자 에탄올 추출물이 더 탁월한 효과를 가진다는 연구결과(Yang et al., 2007)와 모자반과에 속하는 5가지 갈조류 사이에서 계절적 요인에 따른 생리활성 물질 함량의 유의적 차이를 보인다는 연구결과(Kamiya et al., 2010)에 비추어 볼 때, 같은 종에 속하더라도 그 종류와 서식환경에 따라 cytokine 분비량 억제에 미치는 영향이 다른 것에 기인되는 결과라고 사료된다.



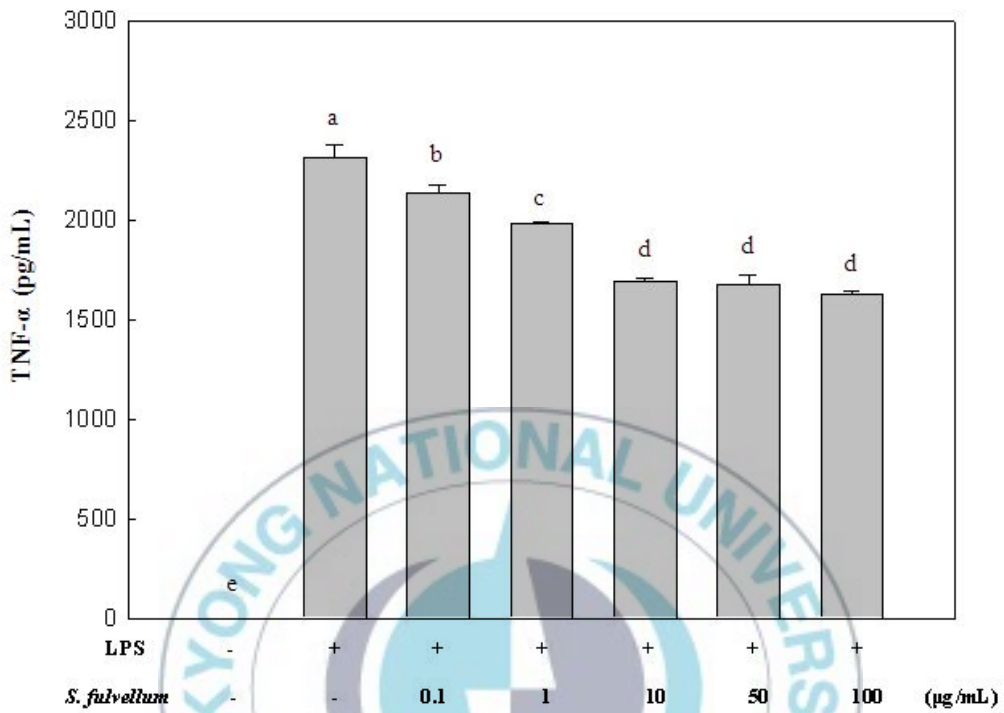


Fig. 5. Effect of *Sargassum fulvellum* ethanol extract on TNF- α production in LPS-stimulated macrophage.

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

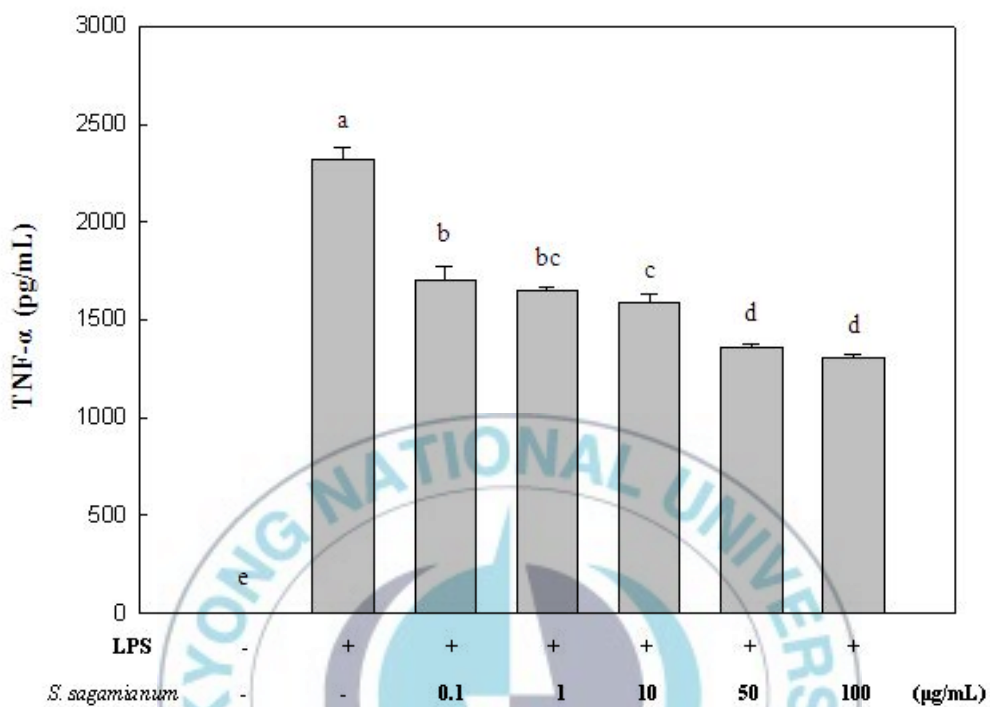


Fig. 6. Effect of *Sargassum sagamianum* ethanol extract on TNF- α production in LPS-stimulated macrophage.

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

3-2. IL-6 분비량

IL-6는 단핵구를 포함한 여러 종류의 세포에서 분비되며 다양한 기능을 가지는 대표적인 pro-inflammatory cytokine 중의 하나로 초기 면역반응에서 중요한 역할을 한다. 이는 B세포의 분화를 촉진하여 항체생산을 증가시키는 반면, 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). 따라서 모자반 및 비틀대 모자반 추출물이 IL-6 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해, RAW 264.7 세포에 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$) 단독처리 혹은 LPS와 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 배지로 분비된 IL-6 cytokine의 분비량을 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물에 의한 IL-6 분비량은 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히, 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리하였을 때, IL-6 분비량이 각각 354.09 ± 15.8 및 271.03 ± 6.6 으로 낮은 값을 나타내었다. 또한, LPS 단독 처리 시 IL-6 분비량이 587.38 ± 10.56 인 것과 비교해 볼 때, 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 53% 이상의 높은 감소를 보여 모자반 에탄올 추출물에 비해 IL-6 분비 억제에 더 큰 효과가 있음을 나타내었다(Fig. 7, 8). 이는 애기땅빈대 에탄올 추출물(Park et al., 2011)과 청서익기탕 에탄올 추출물(Lee, 2011)을 처리한 후 IL-6 분비량이 농도의존적으로 유의적인 감소를 보인 것과 유사한 경향을 보였다. 또

한, 애기땅빈대와 청서익기탕 에탄올 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, 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 경우에는 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 매우 낮은 농도에서, 모자반 에탄올 추출물의 경우에는 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 비교적 낮은 농도에서 50% 이상의 IL-6 분비량 감소를 보임에 따라 육상식물이나 한약재보다도 해조류인 모자반 및 비틀대 모자반이 항염증 기능성 물질로의 높은 가능성을 가지고 있다고 사료된다.



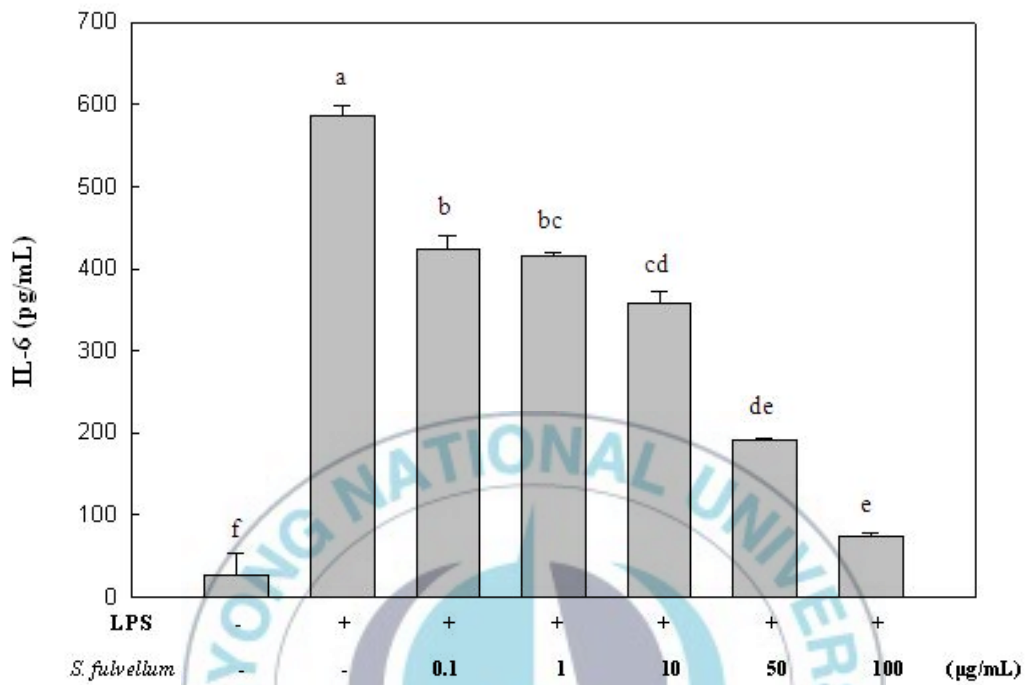


Fig. 7. Effect of *Sargassum fulvellum* ethanol extract on IL-6 production in LPS-stimulated macrophage.

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

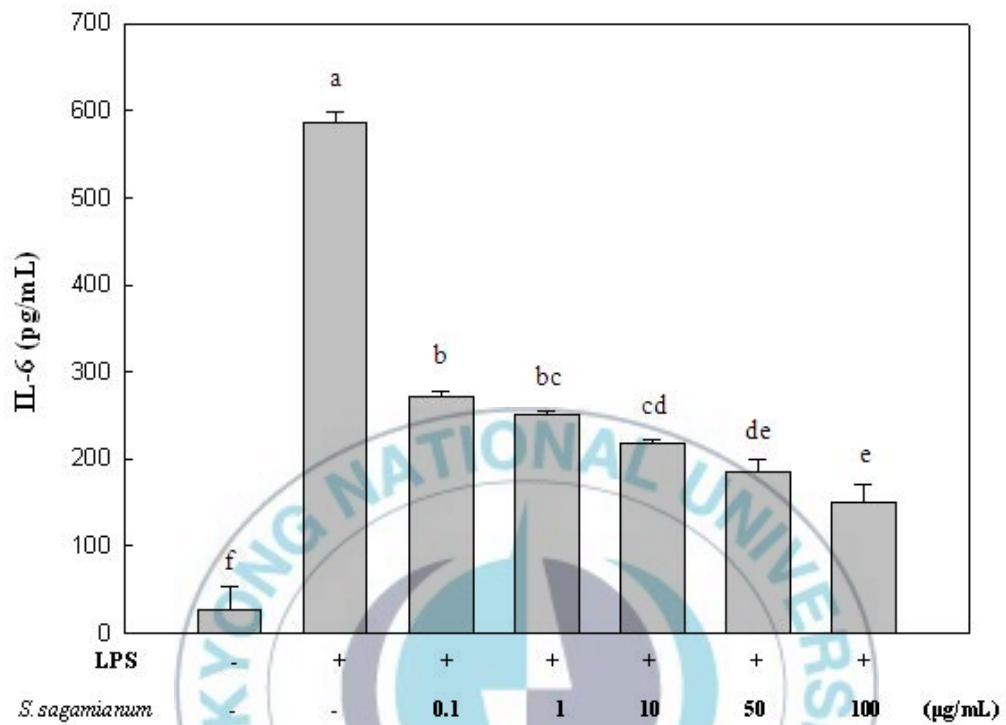


Fig. 8. Effect of *Sargassum sagamianum* ethanol extract on IL-6 production in LPS-stimulated macrophage.

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

3-3. IL-1 β 분비량

IL-1 β 는 IL-6, TNF- α 와 함께 대표적인 염증성 cytokine으로 NO를 생성하게 하는 매개물질이며(Benvenistem, 1997; Murphy, 2000), 국소염증을 발생시키고 T세포의 활성화, B세포의 성숙 및 NK cell의 activity를 활성화 시키는 cytokine이다(Chae et al., 2007; Delgado et al, 2003). 따라서 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 IL-1 β 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해, LPS(1 μ g/mL)로 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 분비된 IL-1 β cytokine의 분비량을 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과, 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 비교적 낮은 농도인 0.1 μ g/mL로 처리하였을 때부터 약 50% 이상 높은 분비량 감소를 보였다. 특히, 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 최고농도인 100 μ g/mL의 농도로 처리하였을 경우, LPS와 추출물 모두 처리하지 않은 대조군과 유사한 분비량을 보여 높은 IL-1 β 분비 억제 활성을 나타내었다(Fig. 9, 10). 이는 급성기 염증반응에서 혈액 내 IL-1 β 및 TNF- α 의 농도가 급격히 증가하며 IL-1 β 분비량이 TNF- α 분비와 상호 상승효과를 나타낸다(Mathiak et al., 2000)는 보고에 따라, 모자반 및 비틀대 에탄올 추출물 처리에 의해 TNF- α 분비량이 감소되는 경향을 보인 것과 관련되는 것으로 보인다. 이와 유사한 결과로, 씌바귀 에탄올 추출물 첨가 시 RAW 264.7 세포배양실험에서 TNF- α 의 분비량이 첨가농도에 의해 감소하는 경향을 보임에 따라 IL-1 β 의 분비량 또한 감소한 연구 결과가 있다(Lee, 2011). 또한, 등골나무 에탄올 추출물의 항염증 효과(Lee et al.,

2011)에서 추출물 처리 시 TNF- α 의 분비량 감소와 더불어 IL-1 β 분비량도 농도 의존적인 감소를 보였으며, 최고농도 처리구에서 무처리구와 비교시 유의적으로 같은 수준의 분비량을 보인 것과 유사한 결과를 보였다. 갈조류에 속하는 잔가시 모자반(*Sargassum micracanthum*) 에탄올 추출물의 항염증 효과에서도 TNF- α 와 IL-6의 농도의존적인 감소와 더불어 현저히 낮은 수준의 IL-1 β 분비량 감소를 나타내었다. 이는 잔가시 모자반 에탄올 추출물에 포함되어 있는 phlorotannin이 46.91 $\mu\text{g/mL}$ 로 비교적 높은 함량을 보임에 따른 결과라고 보고되어 있다(Yoon et al., 2009). Phlorotannin은 갈조류에서 주로 추출되어지는 phenolic compound로써 항산화, 항균, 항알레르기 및 항염증 등의 생리활성을 보인다고 알려져 있다(Li et al., 2011; Jung et al., 2009). 이러한 연구결과들을 바탕으로 할 때, 갈조류인 모자반 및 비틀대 모자반에도 포함되어있는 phlorotannin이 높은 IL-1 β 감소효과에 있어 주요한 물질로 작용되었을 것이라 추정되며, 이에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

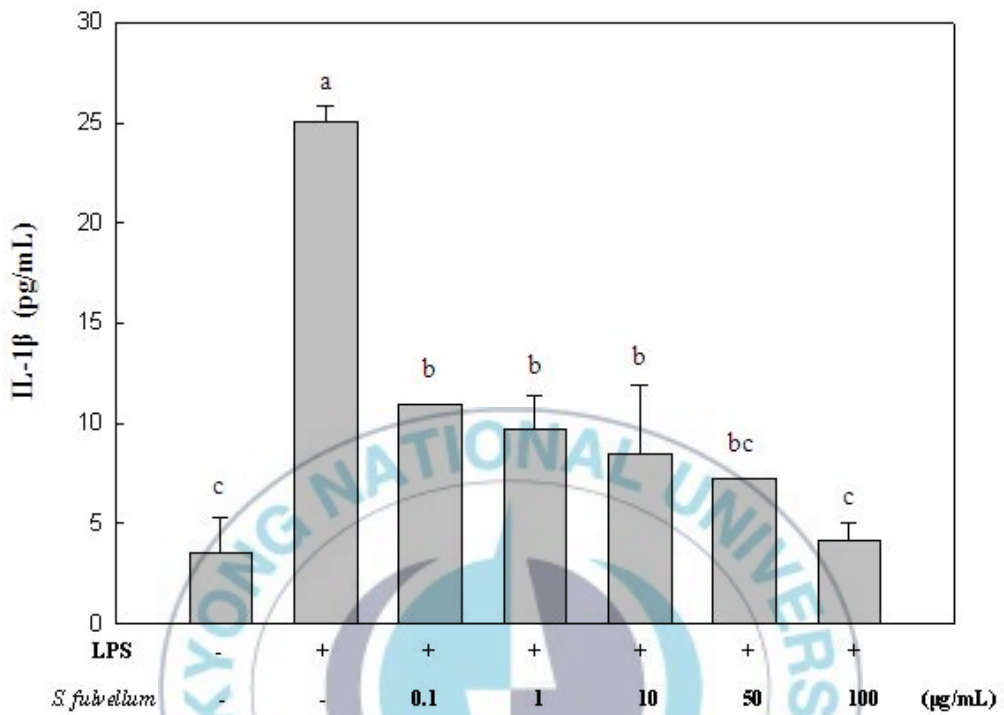


Fig. 9. Effect of *Sargassum fulvellum* ethanol extract on IL-1 β production in LPS-stimulated macrophage.

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

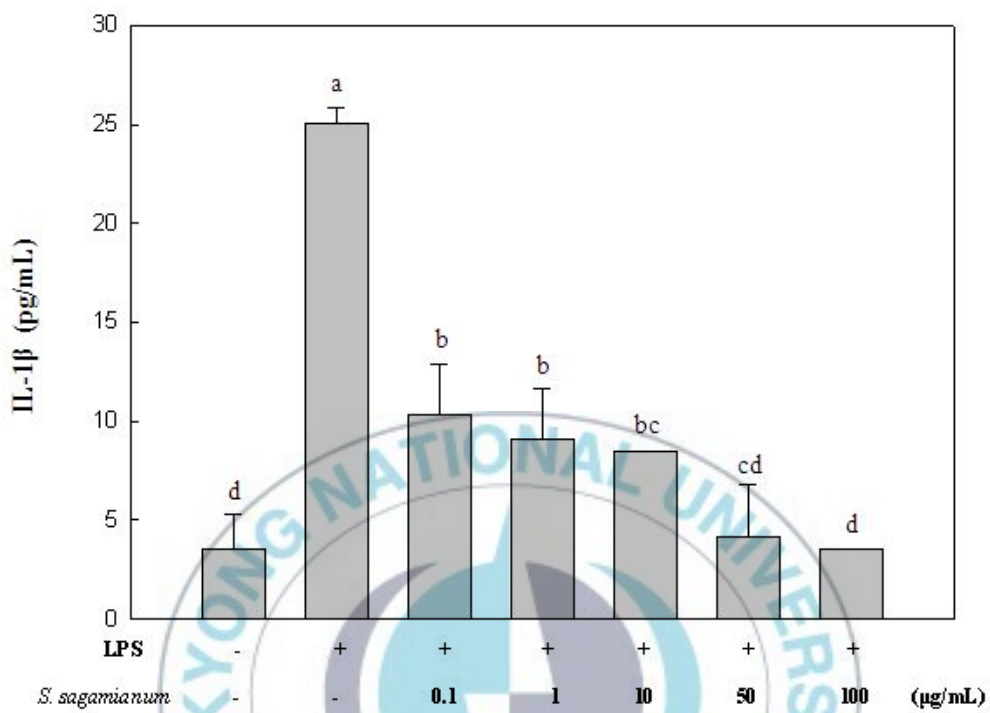


Fig. 10. Effect of *Sargassum sagamianum* ethanol extract on IL-1 β production in LPS-stimulated macrophage.

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

4. COX-2 단백질 발현 억제 효과

COX-2는 LPS 및 cytokine에 의해 발현이 유도되며, 급성염증반응에서 prostaglandin(PG)의 합성에 관여하고, 다량의 PG를 생성함으로써 염증반응에 관여하는 것으로 밝혀져 있다(Hume et al., 2007). 따라서 모자반 및 비틀대 모자반 추출물에 의한 COX-2 단백질 발현을 관찰하기 위해 immunoblotting을 실시하여 단백질 발현을 측정하였다. 모자반 에탄올 추출물이 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, LPS에 의해 증가된 COX-2의 단백질 발현 양이 모자반 에탄올 추출물 농도 의존적으로 감소됨을 나타내었고, 특히 모자반 에탄올 추출물 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 COX-2 단백질 발현이 크게 억제됨을 확인하였다(Fig. 11). 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 경우, 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 COX-2 단백질 발현이 다소 증가되었으나 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때는 LPS를 처리하지 않은 대조구와 단백질 발현정도가 비슷한 수준으로 나타나 COX-2 단백질 발현을 현저히 감소시킴을 나타내었다(Fig. 12).

이와 같은 결과들은 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 처리가 염증반응에 있어 COX-2 단백질 발현 양을 감소시켜 염증성 물질인 prostaglandin의 생성과 분비를 효과적으로 억제함으로써 항염증 효과를 나타냄을 시사한다.

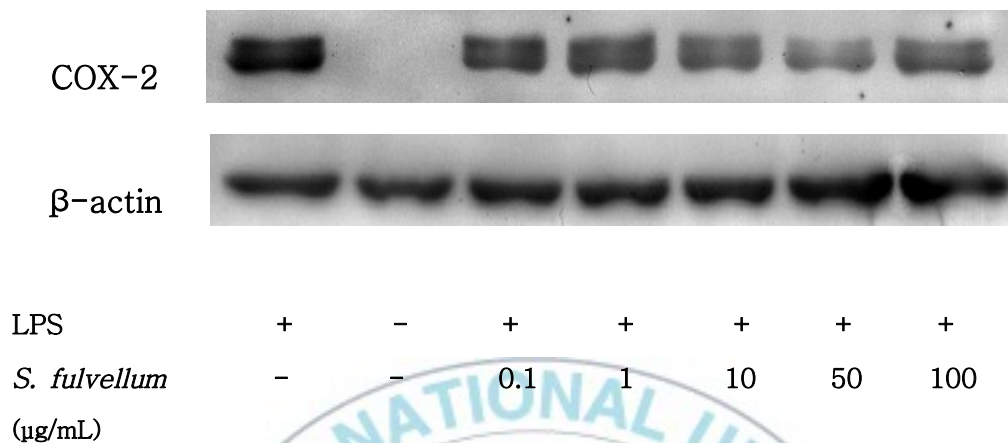


Fig. 11. Inhibitory effects of *Sargassum fulvellum* ethanol extract on the protein expression of COX-2 in RAW264.7 cells.



Fig. 12. Inhibitory effects of *Sargassum sagamianum* ethanol extract on the protein expression of COX-2 in RAW264.7 cells.

요 약

모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 항염증 활성을 알아보기 위해 LPS 처리한 RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성억제를 관찰하고, COX-2의 단백질 발현정도를 알아보았다.

1. 세포 증식능

모자반 및 비틀대 모자반 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 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

모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물에 의한 NO 생성량이 LPS 처리구 보다 유의적으로 감소함을 확인하였으며, 각각 50 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 처리하였을 때, 추출물을 처리하지 않은 군과 비교하여 약 52% 이상의 NO 생성 저해를 일으키는 것을 관찰하였다.

3. Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

3-1. TNF- α 분비량

모자반 에탄올 추출물을 처리하였을 경우, 모든 농도 처리구에서 TNF- α 의 생성이 감소되었으며, 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 37% 이

상 그 분비량이 감소되었다. 비틀대 모자반의 경우에는 특히 50 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 낮은 분비량을 보였다.

3-2. IL-6 분비량

모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물에 의한 IL-6 분비량은 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히, 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 낮은 농도인 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 으로 처리하였을 때, 53% 이상의 높은 감소를 보여 모자반 에탄올 추출물에 비해 IL-6 분비 억제에 더 큰 효과가 있음을 나타내었다.

3-3. IL-1 β 분비량

모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 비교적 낮은 농도인 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였을 때부터 약 50% 이상 높은 분비량 감소를 보였다. 특히, 모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 최고농도인 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 경우, LPS와 추출물 모두 처리하지 않은 대조군과 유사한 분비량을 보여 높은 IL-1 β 분비 억제 활성을 나타내었다.

4. COX-2 단백질 발현 억제 효과

모자반 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 처리한 결과, LPS에 의해 증가된 COX-2의 단백질 발현 양이 농도 의존적인 감소를 나타내었으며, 특히 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 현저히 감소하여 PG 억제를 통한 항염증효과를 관찰하였다.

참고문헌

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.

Benvenistem, E. N. 1997. Immunology of the nervous system. Oxford University Press, New York, USA. 419-459.

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

Bredt, D. S., Snyder, S. H. 1994. Transient nitiric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuraon* 13: 301-313.

Bae, S. J. 2004. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines in vitro. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 480-486.

Cui, C. B., Lee, E. Y., Lee, D. S., Ham, S. S. 2002. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from

Korean traditional doenjang added sea tangle. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 322-328.

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.

Choi, J. H., Kim, I. S., Kim, J. I., Yoon, T. H. 1992. Studies on anti-aging action of brown algae (*Undaria pinnatifida*). *Bull Korean Fish Soc* 25: 181-188.

Cho, S. H. 2006. Antioxidant profiles of extracts from *Sargassum sagamianum*. Pukyong National University MS Thesis 21.

Chen, Y. Y., Liu, J. F., Chen, C. M., Chao, P. Y., Chang, T. J. 2003. A study of antioxidative and antimutagenic effects of *Houttuynia cordata* thunb using an oxidized frying oil-fed model. *J Nutr Sci Vitaminol* 49: 327-333.

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.

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

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

Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes; advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875.

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

Hsueh, W. A., Anderson, P. W. 1992. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetic mellitus. *Hypertension* 20: 253-263.

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.

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

Hoe, 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.

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.

Indergaard, M., Minsaas, J. 1991. Animal and human nutrition. In: Guiry M. D. and Blunden G. (eds). *Seaweed resources in Europe: Uses and Potential*. John Wiley & Sons Ltd. New York 21-64.

Jaffrey, S. R., Snyder, S. H. 1995. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 417-440.

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.

Jin, D. Q., Lim, C., S., Sung, J. Y., Choi, H. G., Ha, I., H., Han, J. S. 2006. *Ulva conglabata*, a marine alga, has neuroprotective and anti-inflammatory effects in murine hippocampal and microglial cells. *Neurosci Lett* 402: 154-158.

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

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.

Kamiya, M., Nishio, T., Yokoyama, A., Yatsuya, K., Nishigaki,

T. 2010. Seasonal variation of phlorotannin in sargassacean species from the coast of the sea of Japan. *Phyc Res* 58: 53-61.

Kawashima, S., Hayashi, M., Takii, R., Kimura, H., Zhang, H. L., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Murata, K., Oomoto, Y., Onozaki, K. 1998. Serotonin derivative, N-(p-coumaroyl) serotonin, inhibits the production of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , and IL-6 by endotoxin-stimulated human blood monocytes. *J. Interf. Cytok. Res.* 18: 423-428.

Kim, R. G., Shin, K. M., Chun, S. K., Ji, S. Y., S대, S. H., Park, H. J., Choi, J. W., Lee, K. T. 2002. In vitro antitflammatory acgtivity of the essential oil from *lifularia fischeri* var. spiciformis in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* 46: 343-347.

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

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

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

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

Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Synder, S. H., Russell, S. W., Murphy, W. J. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9730-9734.

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, 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, H. S., Jung, H. S., Kuen, H. S. 2000. Preparation of antibacterial agent from seaweed extract and its antibacterial effect. *J Korean Fish Soc* 33: 32-27.

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

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

Lee, J. H., Lee, K. H., Yoo, H. I., Zhou, X. L., Kim, Y. S., Choi, H. G., Nam, K. W. 2006. Antimicrobial activity of *Neorhodomela aculeata* extracts against human skin pathogens. *J Kor Fish Soc* 39: 292-296.

Lee, H. J. 2011. Anti-inflammatory effect of Chungseoikgitang

ethanol extract on allergic-inflammatory reaction. Wonkwang university DS thesis 1-20.

Lim, C. S., Jin, D. Q., Sung, J. Y., Lee, J. H., Choi, H. G., Ha, I. H., Han, J. S. 2006. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Neorhodomela aculeata* in hippocampal and microglial cells. *Bioll Pharm Bull* 29: 1212-1216.

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. *British J Pharmacol* 139: 11-20.

Murphy, S. 2000. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29: 1-13.

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. *British 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.

Mori, M. 2007. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr* 137: 1616-1620.

Oh, Y. S., Lee, I. K., Boo, S. M. 1990. An annotated account of Korean economic seaweeds for food, medical and industrial uses. *Kor J Phycol* 5: 57-71.

Park, C., Choi, Y. H. 2009. *Hizikia fusiforme* inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by PMA through inactivation of NF κ B. *J Life Sci* 19: 1396-1402.

Park, S. C., Son, D. Y. 2011. Inhibitory effects of *Euphorbia supina* Rafin on the production of pro-inflammatory mediator by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 486-492.

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.

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.

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.

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.

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

Suh, K. H., Ahn, K. H., Lee, H. S., Lee, H. G., Cho, J. K., Hong, Y. K. 1999. Biosorption of Pb and Cr by using *Sargassum saganminum*. *J Koreman Fish Soc* 32: 399-403.

Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S. Keum, Y. S., Park, K. K., Lee, S. S. 2001. Molecular mechanism underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* 480: 243-268.

Shim, J. M. Ahn, B. G., Kang, C. W. 2003. The neutral characteristic and effect of brown algae as functional substances in poultry. *Korean Soc Poultry Sci* 16: 38-52.

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

Tsao, L. T., Lee, C. Y., Huang, L. J., Kuo, S. C., Wang, J. P. 2002. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production RAW264.7 macrophages by asynthetic carbazole, LCY-2-CHO. *Biochem Pharmacol* 63: 1916-1968.

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.

Tsuru, S., Nomoto, K. 1983. Effect of PSK on specific tumor immunity to syngeneic tumor cells. *J Allergy Clin Immunol* 4: 215-219.

Vodovotz, Y., Russell, D., Xie, Q. W., Bogdan, C, Nathan C. 1995. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophage. *J Immunol* 154: 2914-2925.

Weisz, A., L. Ciatello, H. Esumi. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209-215.

Waaland, J. R. 1981. Commercial utilization. In; Loban C.S. and Wynne M.J.(eds). *The biology of seaweeds*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 726-741.

Yang, H. M., Lim, S. S., Yeon, S. L., Shin, H. K., Oh, Y. S., Kim,

J. K. Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. 2007. *Korean J Food Sci Technol*. 39: 342-347.

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* extract in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Technol* 39: 464-469.

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 Biosci* 3: 130-143.

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.

감사의 글

길게만 느껴졌던 2년이라는 시간이 흘러 석사과정을 마무리하는 시점이 다가오니 감회가 새롭습니다. 저에게는 새로운 도전이자 시작이었던 석사과정을 무사히 마칠 수 있도록 도와주신 많은 분들께 이 글을 통해서나마 감사의 뜻을 전하고자 합니다.

먼저 학문적인 부분뿐만 아니라 앞으로 제 인생을 꾸려나감에 있어 많은 가르침을 주신 안동현 교수님께 정말 감사합니다. 그리고 부족한 저의 논문을 심사해 주신 조영제 교수님, 전병수 교수님을 비롯하여 학부 때부터 전공에 대한 지식을 습득하게 도와주신 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 이양봉 교수님, 김영목 교수님께도 감사의 인사를 드리고 싶습니다.

2년 동안의 실험실 생활에 있어 많은 시간을 함께 했던 실험실원들에게도 감사합니다. 실험적인 면에서 많은 도움을 주었던 꽃봉우리 언니와 어찌면 인생에 있어 중요한 순간이 될 수 있는 과정을 함께 한 금동, 찬, 슬아, 현지, 다현 그리고 이제 막 그 과정을 시작하려는 희예에게 고맙다는 말과 함께 각자에게 주어진 시간동안 끝까지 최선을 다하여 자신의 가능성을 높이는 기회를 만들었으면 하는 바람을 전합니다. 그리고 항상 밝은 표정으로 선배들을 도와주는 실험실의 막내들 가영, 원민, 보경이를 비롯하여 호기심 많은 홍민이에게도 정말 고맙습니다. 또한 대학원 동기로서 선배 사회인으로서 가장 많은 도움을 주고 받았던 보경이에게도 이 자리를 빌려 고맙다는 말을 전하며, 실험을 진행할 수 있도록 도와주신 이미지시스템공학과와 전영태 교수님과

항상 실험준비를 잘 도와주었던 백관 대학원생에게도 감사의 인사를 전합니다.

저의 영원한 지지자이자 긍정적 힘의 원동력인 멋쟁이 아버지와 여당당 어머니께 감사하고 존경한다는 말을 하고 싶습니다. 부모님의 격려와 응원 없이는 큰 딸이 이만큼 성장하지 못했을 것입니다. 그리고 세상에서 제일 귀여운 내 동생 민화에게도 언니의 고마운 마음은 말로 표현을 다 할 수가 없습니다. 우리 가족 정말 사랑합니다.

마지막으로, 고등학교 때부터 변함없이 나를 지지해주던 친구들에게도 감사의 말을 전하고자 합니다. 먼저, 같은 길을 가면서 서로 어려운 부분들을 같이 공유할 수 있어 든든했던 해송이에게 감사의 뜻을 보내고 싶고, 앞으로도 어려운 상황들을 잘 극복할 수 있도록 서로의 버팀목이 되자고 말하고 싶습니다. 그리고 나의 푸념들을 거리낌 없이 들어 주었던, 곧 사회에서 큰일들을 하게 될 전마현(미현이)과 황지(지연이), 우리 중에 제일 먼저 아기 어머니가 될 스댕(지선이)에게도 정말 너희들이 있어 행복하고 감사하다고 전하며 지금껏 그랬던 것처럼 서로에게 힘을 줄 수 있는 친구가 되었으면 합니다.

위의 모든 분들에게 한 번 더 감사의 인사를 전하며, 그 동안 주셨던 도움, 격려, 꾸지람 등이 또 다른 출발선에 선 저에게는 앞으로 있을 어려운 상황을 이겨내고 제가 원하고자 하는 일을 함에 있어 큰 힘이 될 것입니다. 감사합니다.