

Anti-inflammatory effects of *Ishige sinicola* ethanol extract in LPS-induced RAW 264.7 cell and mouse model

Ji-Hye Kim¹, Min-Ji Kim¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Sun-Hee Park¹, Kwang-Su Cho¹, Go-Eun Kim¹, Xiaotong XU¹, Da-Hye Lee¹, Ga-Ryeong Park¹, Dong-Hyun Ahn^{1*}

¹Department of Food Science and Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 46041, Korea

LPS로 유도된 RAW 264.7 Cell과 마우스 모델에 대한 넓패(*Ishige sinicola*) 에탄올 추출물의 항염증 효과

김지혜¹ · 김민지¹ · 김꽃봉우리² · 박선희¹ · 조광수¹ · 김고은¹ · 쉬 시아오통¹ · 이다혜¹ · 박가령¹ · 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소, ²부경대학교 수산과학연구소

Abstract

Inflammation is the first response of the immune system to infection or irritation in our body. The use of medicinal plants has been widely applied as an alternative source for drug development. One of marine natural resources, the anti-inflammatory effect of *Ishige sinicola* ethanol extract (ISEE), was evaluated by using LPS-induced RAW 264.7 cell and mice model. As a result, the production of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α) were inhibited with increasing concentration of ISEE without any cytotoxicity. Furthermore, ISEE suppressed the expression of not only inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65, and mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p38, and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in a dose-dependent manner. In mice ear edema test, the formation of edema was reduced at the highest dosage of ISEE and the reduction of the number of infiltrated mast cells was observed in histological analysis. These results indicate that ISEE has a potent anti-inflammatory activity and can be used as a pharmaceutical material for many kinds of inflammatory disease.

Key words : *Ishige sinicola* ethanol extract, proinflammatory cytokines, nuclear factor kappa B, mitogen-activated protein kinases

서 론

염증이란 조직손상이나 세균 감염 등과 같은 자극에 대한 손상부위를 최소화 하거나 복구하려는 방어적 기능으

로, 손상된 조직을 재생하기 위해 일어나는 신체적 반응이다(1). 이러한 염증반응은 발열, 부종, 통증을 발생시킬 뿐만 아니라 점막손상을 유발하여 염증성 질환 및 암의 발병을 초래하게 된다(2). 대식세포(macrophages)는 식균 작용을 통해 항상성 유지에 관여하며, lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극에 의해 tumor necrosis factor(TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-1 β 등의 pro-inflammatory cytokine을 비롯하여 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 효소의 발현을 통해 nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE2)를 생성하여 염증반응을 유도하고

*Corresponding author. E-mail : dhahn@pknu.ac.kr
Phone : 82-51-629-5831, Fax : 82-51-629-5824
Received 29 November 2017; Revised 23 December 2017;
Accepted 24 December 2017.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

염증이 발생된 부위로 면역세포의 이동이 촉진 된다(3,4). NO는 활성화된 iNOS로부터 생성된 L-arginine으로부터 생성되며(5), NO의 발현과 pro-inflammatory cytokine의 생산은 주로 nuclear factor kappa B(NF-κB)와 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)를 통해 일어난다(6). NF-κB는 보통 세포질에 존재하게 되지만, 염증이 발생하면 핵 안으로 들어가 염증 매개 효소(iNOS, COX-2) 및 염증 매개성 cytokine을 합성하며, 주로 세포질에서 IκB와 결합하여 NF-κB의 활성이 억제된다(7,8). 또한, MAPKs의 활성은 대식세포에서 NO의 생성과 pro-inflammatory cytokine의 발현을 초래한다(9). 따라서 NF-κB 및 MAPKs의 활성을 억제하여 염증성 매개인자들 감소에 영향을 주는 것은 염증반응을 조절하기 위한 신호전달 요소로서 이와 같은 활성을 가지는 천연물을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

해조류는 현재 많은 연구들로부터 다양한 생리활성 물질이 풍부한 것으로 보고되고 있으며, 그중 갈조류는 항암, 고지혈증 개선, 항균 등의 주요 생리 활성이 알려져 있다. 특히 갈조류의 cellulose, alginic acid, fucoidan과 같은 다당류에 관한 생리활성 연구가 활발히 진행 중이며, fucoidan의 경우 항암, 항응고제 등의 다양한 생리활성물질을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다(10-12). 이처럼 다양한 해조류 중 넓패(*Ishige sinicola*)는 갈조식물문(phaeophyte), 민가지말목(Chordariales), 패과(Ishigeaceae)에 속하는 갈조류로서 남부 해안 각지, 제주도, 일본 및 중국에 분포하고, 파도가 조용한 남부 해안과 제주도 등 주로 조간대에서 서식하고 있다(13). 또한 넓패에 대한 연구는 활발히 진행 중이지만 항염증에 대한 실험은 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 넓패의 다양한 활용을 위해 LPS로 유도한 RAW 264.7 세포의 염증 반응에 대한 넓패 에탄올 추출물의 효과를 알아보기 위해 NO 및 전염증성 cytokine(IL-6, TNF-α, IL-1β)의 발현정도, 세포 독성에 대해 조사하였으며, 이를 통해 항염증 활성을 갖는 소재로서의 넓패의 가능성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 넓패는 2014년도 부산 연화리에서 채취하였으며 이를 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조 한 후 분말화 하고 진공 포장하여 -20℃에서 보관하며 사용하였다.

넓패 에탄올 추출물 제조

넓패 건조 분말에 10배의 95% 에탄올을 첨가 하고, 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 24시간 동안 상온에서 교반기를 돌린 후 추출하였다.

원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 취하였고, 이후 남은 잔사를 이와 동일한 방법으로 2회간 반복 추출하였다. 추출한 상층액은 37℃에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하였으며, 농축 후 건조된 시료는 -20℃에서 보관하며 실험에 이용하였다.

실험동물

ICR 마우스(생후 8주령, 수컷)을 오리엔트 바이오로부터 구입하여 귀 부종 및 귀 조직실험에 사용하였으며, 마우스는 온도 20℃, 습도 50%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 부경대학교 동물실험 윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 수행하였다(승인번호 2015-04).

세포배양

대식세포인 RAW 264.7 세포(KCLB 40071)를 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 사용하였으며, DMEM(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum(HyClone Laboratories, Inc, Logan, Utah, USA)과 1% penicillin-streptomycin(HyClone Laboratories, Inc.)을 첨가한 배지를 배양액으로 37℃, 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 시 계대배양을 실시하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

세포의 독성평가

추출물의 세포독성을 평가하기 위해 Kim 등(14)의 방법을 인용하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포(1×10⁶ cells/mL)를 well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 추출물을 농도 별(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL)로 첨가하여 24시간 배양하였으며, 배양 후, 5 mg/mL 농도의 MTT시약을 첨가하여 2시간 재 배양하고 이를 4℃, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 각 well에 dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하고 이를 microplate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율을 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Cell viability}(\% \text{ of control}) = (\text{sample 흡광도} / \text{control 흡광도}) \times 100$$

Nitric oxide 생성량 측정

세포로부터 생성된 NO에 대한 넓패 추출물의 영향을 알아보기 위해 Kim 등(14)의 방법을 약간 변형하여 griess 시약(1% sulfanilamide+0.1% naphthylendiamine dihydrochloride,

1:1) 반응을 이용하여 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. RAW 264.7 세포를 2.5×10⁵ cells/mL의 농도로 48-well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 µg/mL의 LPS와 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 24시간 재 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 상층액과 griess 시약을 1:1의 비율로 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader(Model 550, Bio-rad)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂)의 농도 별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정

세포배양액 중 IL-6, TNF-α 및 IL-1β cytokine의 분비량을 Kim 등(15)의 방법을 인용하여 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody anti mouse IL-6, TNF-α 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating 하였다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척 후 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. 그리고 PBST로 세척한 뒤 microplate에 각 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤, 희석한 biotinylated anti-mouse IL-6, TNF-α detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1β의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후, 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분간 암 반응시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료 시킨 후, microplate reader(Model 550)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot에 의한 단백질 발현 측정

배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, lysis buffer[50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 µg/mL aprotinin, 1% triton X-100, 0.1% NP-40]를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis시킨 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였으며, 30 µL의 lysate를 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene difluoride membrane(PVDF, Bio-rad)에 70 mA에서 1시간 30분 동안 전사시킨 후, Kim 등(16)의 방법에 따라 5% skim milk가 포함된 TBST(tris buffered saline; pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간동안 blocking 하였

다. iNOS, COX-2 및 NF-κB의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF-κB(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 사용하였으며, MAPKs의 발현양을 알아보기 위해 anti-mouse JNK, ERK 및 p38(Cell Signaling Technology, Inc., Denvers, MA, USA) 항체를 사용하여 1:500으로 희석해서 사용하였다. 각각 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBST로 3회 세척하여 ECL(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) 기질과 1-3분간 반응한 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool(Syngene software, Synopics Ltd., Cambridge, UK)를 이용하여 가시화 및 정량하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

귀 부종 측정을 위해 ICR mouse에 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg·body weight 농도가 되도록 200 µL씩 단 회 경구 투여 하고 한 시간 후, 오른쪽 귀에 2.5% croton oil(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 20 µL/ear씩 도포하였다. 귀 두께는 croton oil을 처리하고 5시간 후에 측정하였으며 croton oil 처리한 후 두께의 증가를 부종의 형성으로 간주하였다. 귀 조직 관찰은 ICR mouse의 오른쪽 귀에 추출물을 100 mg/mL 농도로 20 µL씩 도포하고 15분 뒤, 5% croton oil을 20 µL씩 도포하였다. 6시간 후, diethylether로 마취시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin 및 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

세포 독성 평가

넙패 추출물이 대식세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 및 100 µg/mL의 농도로 첨가하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, PBS 처리구와 비교하였을 시 세포의 생존율이 추출물의 모든 처리에서 농도 의존적인 차이를 보이지 않음을 관찰하였다(Fig. 1). 따라서, 넙패 추출물이 RAW 264.7 세포에 대해 독성이 나타나지 않음을 확인 한 후 실험을 진행하였다.

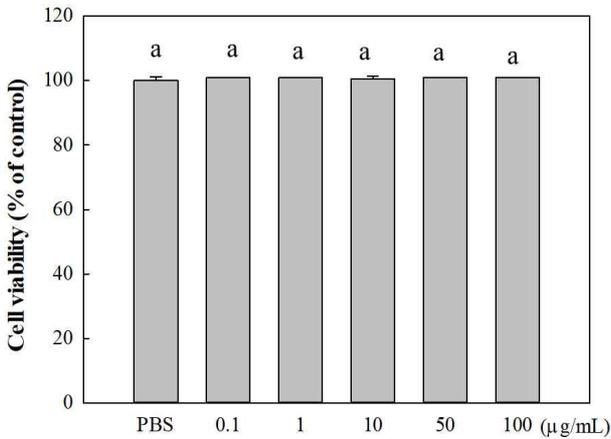


Fig. 1. Effect of *Ishige sinicola* ethanol extract (ISEE) on the cell viability of RAW 264.7 cells.

Cell viability was determined by MTT assay. Cell viability (% of control)=(sample OD at 540 nm/control OD at 540 nm)×100. Means with a letter (a) above the bars are not significantly different (p>0.05).

NO 생성억제 효과

NO는 L-arginine에서 산화질소 합성효소에 의하여 생성되는 산화물질로서 암 생성, 피부손상 및 노화의 주요 원인이 되며 매우 불안정한 화합물로서 LPS와 같은 염증유발물질에 의한 과도한 증가는 염증을 유발하고 조직의 손상을 초래한다(17,18). 따라서 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO에 대해 넓패 에탄올 추출물의 억제효과를 확인하였다(Fig. 2). RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화시킨 후, LPS 처리군은 LPS를 처리 하지 않은 처리 군에 비하여 10배 이상 NO의 농도가 높아졌음을 확인할 수 있었다. 추출물을 처리하였을 경우, 전반적으로 시료의 농도가 증가할수록 NO 생성 억제능이 증가하였으며, 특히 100 µg/mL에서 38% 이상 감소를 보임을 확인하였다.

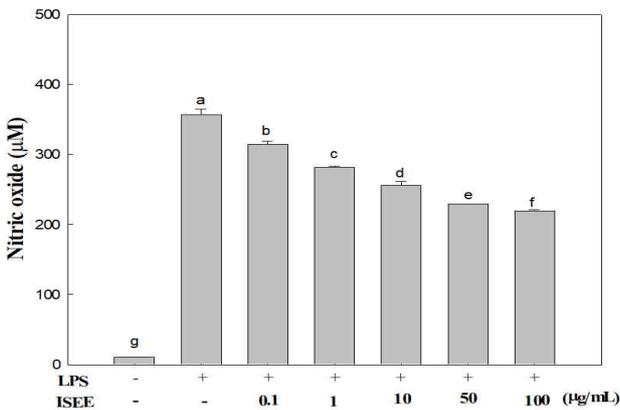


Fig. 2. Inhibitory effect of *Ishige sinicola* ethanol extract (ISEE) on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

The culture media of the treated cells were used to measure NO level. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different (p<0.05).

Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

사이토카인은 다양한 세포들에서 분비되어 손상이나 감염에 대한 면역반응 조절과 세포간 신호전달을 담당하는 물질이다(19). 그중, pro-inflammatory cytokine은 염증 반응에서 자연히 동반되는 매개물로서 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병리적인 조건 하에서 그 발현정도가 증가되며 중추신경계의 염증반응 확장(20)과 피부염증 및 암 발생 등에서 중요한 역할을 한다(21). 대표적인 pro-inflammatory cytokine은 IL-6, TNF-α 및 IL-1β cytokine가 있다(22). LPS로 염증이 유발된 RAW 264.7 세포는 종양 괴사 인자인 TNF-α를 생성하는데 이는 전사인자를 활성화시키며 분비된 TNF-α 및 LPS는 IL-6 및 IL-1β의 생성을 유도하여 NO 생성과 국소적 염증을 발생시켜 염증반응을 지속시키게 된다(23,24). 따라서 초기 면역 반응과 염증단계에서 중요한 역할을 하는 pro-inflammatory cytokine의 생성을 저해시, 염증반응이 조절될 가능성이 높다고 보고하였다(25). 본 연구에서는 넓패 추출물이 pro-inflammatory cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후 추출물을 농도별로 처리하여 ELISA 방법을 통해 측정하였다. 그 결과(Fig. 3), IL-1β의 분비량이 넓패 추출물의 50 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 LPS 처리구보다 62% 감소하였다(Fig. 3A). 또한 LPS 자극에 의해 유도되는 IL-6, TNF-α cytokine의 생성이 각각 33.87%, 25.23% 감소를 보였다(Fig. 3B-C). 이는 넓패 에탄올 추출물이 RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine이 억제되어 항염증 효과에 관여하는 것을 의미한다.

넓패 에탄올 추출물의 iNOS, COX-2, NF-κB p65 발현 억제 효과

iNOS는 보통 세포 내 존재하지 않으나 체내에 염증반응이 일어나면 세포에서 iNOS의 발현이 증가되어 다량의 NO가 생성되며 이는 신경손상, 조직 손상 등과 함께 혈관 투과성이 증가되어 부종 및 발열 등의 염증반응을 촉진시킨다(26,27). 또한, COX-2는 염증 매개 물질인 PGE2의 형성에 관여하며, NF-κB는 염증반응과 관련된 promoter에 결합되어 LPS 등에 의해 활성화된 이후 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2 등의 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(28,29). 따라서 이들 매개인자(iNOS, COX-2 및 NF-κB)의 발현 양에 미치는 추출물의 항염증 효과를 확인 하였다. RAW 264.7 세포에 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 및 100 µg/mL 농도로 처리하고 각 단백질의 발현 양을 측정된 결과(Fig. 4), LPS 단독 처리구에는 각 단백질의 발현양이 눈에 띄게 증가하였으나 추출물을 처리하였을 때, 그 발현양이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수가 있었다. 특히, 50 및 100 µg/mL 농도에서 PBS 처리구와 유사한 발현 양을 보여 탁월한 항염증 효과를 확인하였다. 또한, iNOS의 단백질 발현 감소 결과는 iNOS의 활성화

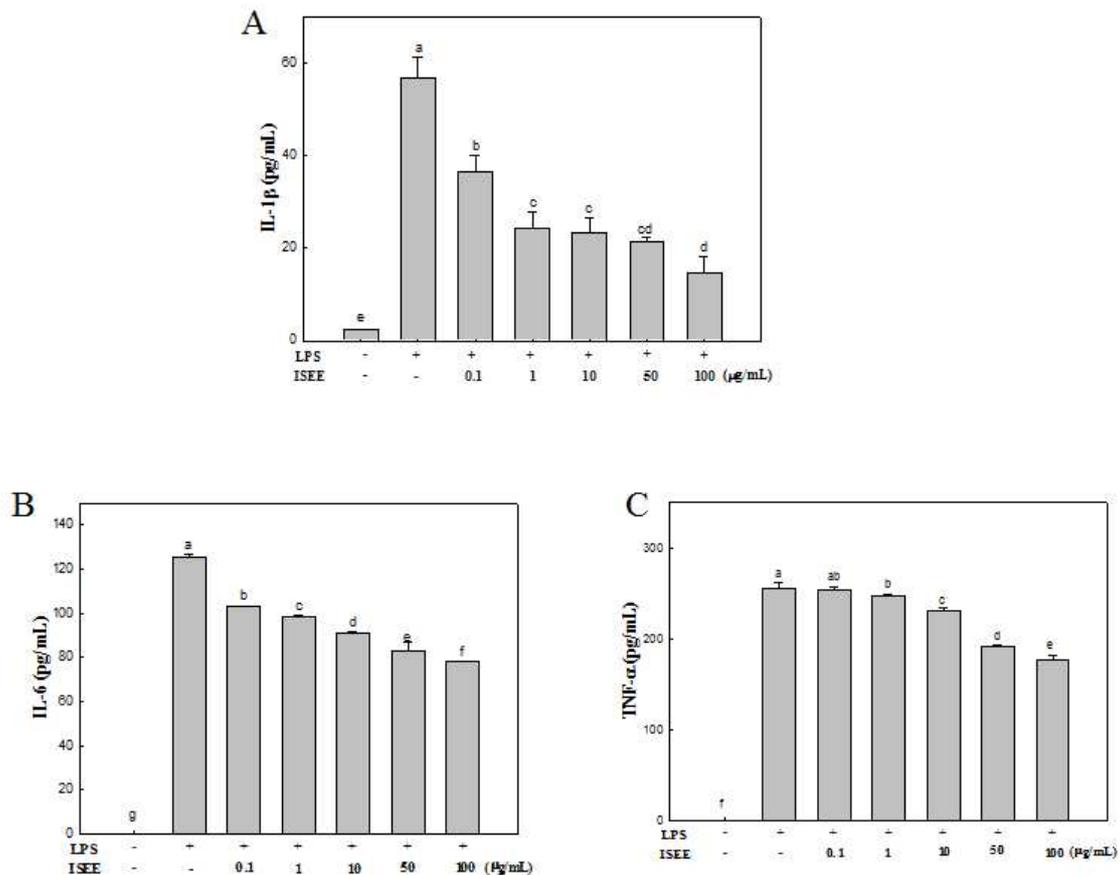


Fig. 3. Inhibitory effect of *Ishige sinicola* ethanol extract (ISEE) on the production of IL-1 β (A), IL-6 (B), and TNF- α (C) in LPS-induced RAW 264.7 cells.

The levels of pro-inflammatory cytokines in the cell culture media were measured by ELISA. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

로부터 생성되는 NO의 분비량 감소 결과와도 관련이 있음을 알 수 있다. 넓패 추출물은 최종 농도인 100 $\mu\text{g/mL}$ 과 비교 하였을 때, 각각 iNOS는 65%, COX-2는 67%, NF- κB 는 56%의 발현양 감소를 확인하였다(Fig. 4A-C). 이러한 결과를 바탕으로 NF- κB 의 활성화억제를 통해 COX-2 및 iNOS 발현을 억제하며 PGE2와 NO의 생성을 저해하여 항염증 효과를 나타낸다고 사료된다.

넓패 에탄올 추출물의 MAPKs 발현 억제 효과

MAPKs는 pro-inflammatory cytokine에 중요한 조절인자로서 ERK, JNK, p38 등의 신호전달경로를 가지고 있다. 이러한 활성화는 인산화에 의해 나타나며, 신호전달은 주로 LPS와 같은 염증자극에 반응하며 세포내에서 활성화되어 사이토카인 전사를 유도한다(30). 따라서 인산화된 MAPKs의 발현양을 western blot을 통해 알아본 결과(Fig. 5), LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 p-ERK, p-p38의 발현이 넓패 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다, 특히 p-ERK, p-p38, p-JNK의 발현은 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 LPS 단독 처리구의 발현양에 비하여 인산화

된 p38, ERK 및 JNK의 발현양이 각각 19%, 52% 및 48% 감소하였다(Fig. 5A-C). LPS는 MAPKs와 NF- κB 를 활성화를 통해 NO 및 pro-inflammatory cytokine을 발생시킨다. 이러한 과정을 통해 염증반응에 관여한다. 따라서 본 연구의 결과를 종합해 볼 때 넓패 추출물의 염증 매개성 물질 감소 효과는 NF- κB 의 활성화 및 MAPKs 인산화 억제로 인한 항 염증효과로 사료된다.

귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

Mast cell은 모든 피부조직이나 점막조직에서 관찰할 수 있다. 주로 염증, 알레르기에 중요한 역할을 하는 세포이다(31). 염증반응이 발생하면 활성화된 mast cell은 염증 매개체들을 방출한다. 그 중 protease나 histamine과 같은 혈관확장 물질들을 분비하며 혈관확장, 부종, 발열, 호중구의 활성화, 비만세포 조직의 침윤 등이 있으며, 이는 외부 환경에 의해 손상된 부위를 복구 시키려는 일련의 생체과정이다(32,33). 이에 본 연구는 염증 반응 중 하나인 부종에 대한 넓패 에탄올 추출물의 부종 억제 효과 및 조직 내의 mast cell 억제 효과를 알아보기 위해 *in vivo* 실험을 진행하

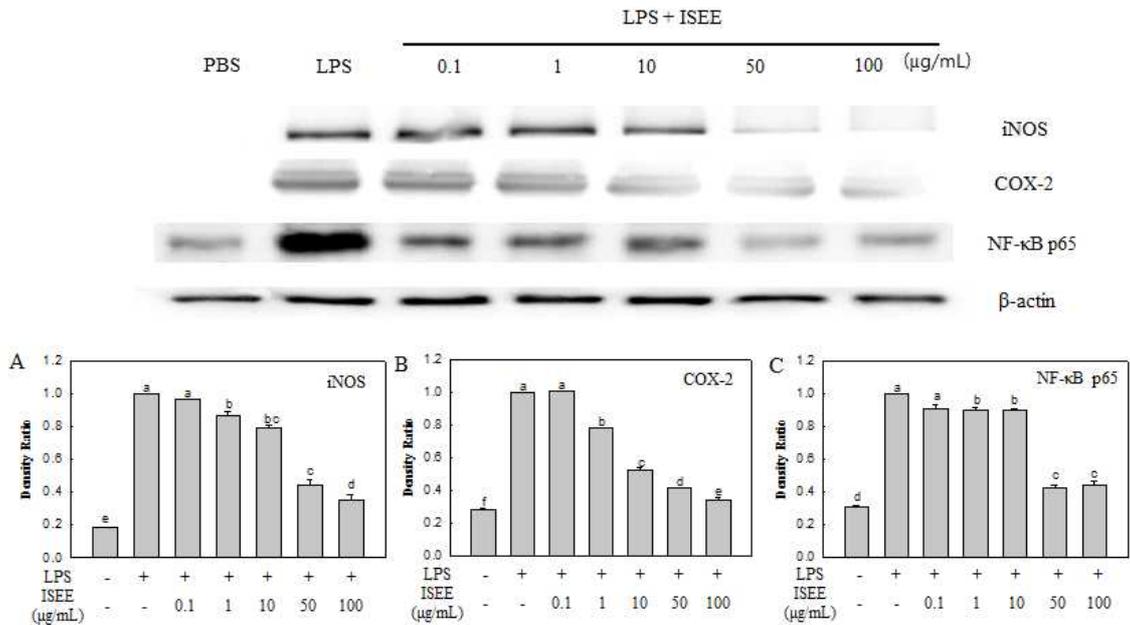


Fig. 4. Effect of *Ishige sinicola* ethanol extract (ISEE) on LPS-induced iNOS (A), COX-2 (B), and NF-κB p65 (C) expression in LPS-stimulated RAW 246.7 cells.

The levels of iNOS, COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF-κB in nuclear protein were decided by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of ISEE (0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL) and LPS (1 μg/mL) and the proteins were detected using specific antibodies. For quantification, the expression data were normalized to the β-actin signal. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different (p<0.05).

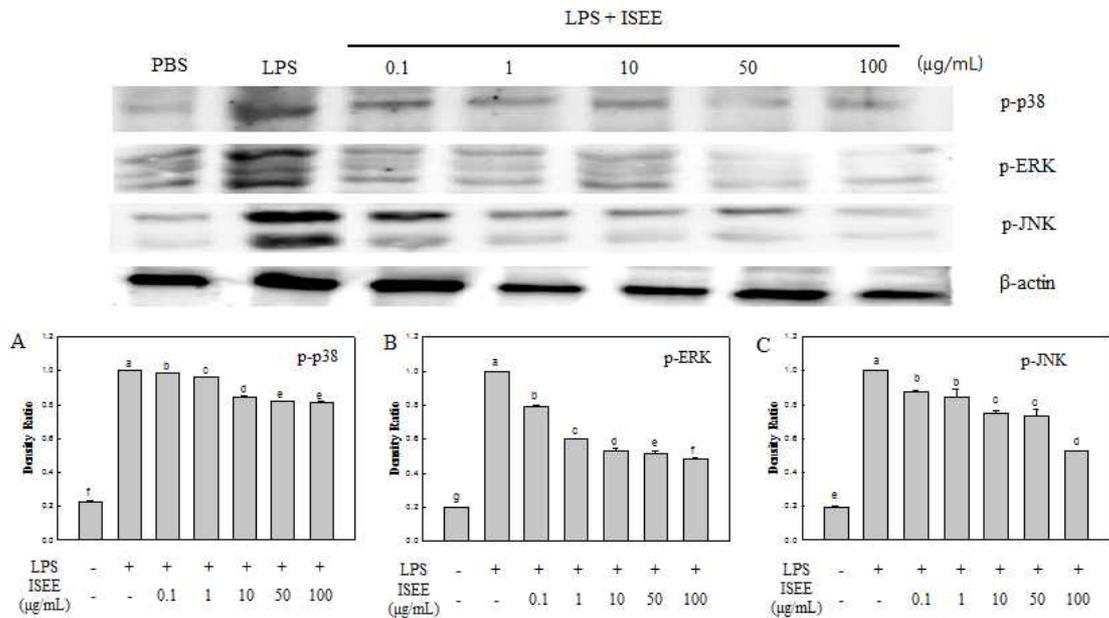


Fig. 5. Effect of *Ishige sinicola* ethanol extract (ISEE) on MAPKs expression in LPS-induced RAW 246.7 cells. The levels of p-p38 (A), p-ERK (B), and p-JNK (C) in the cytosolic protein were decided by western blot analysis.

RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of ISEE (0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL) and LPS (1 μg/mL) and the proteins were detected using specific antibodies. For quantification, the expression data were normalized to the β-actin signal. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different (p<0.05).

였다. Positive control으로 사용된 합성 스테로이드인 prednisolone은 10 및 50 mg/kg·body weight의 농도로 진행 하였으며, 넓패 에탄올 추출물은 10, 50, 250 mg/ kg·body

weight 농도가 되도록 200 μL씩 경구 투여 한 후 croton oil로 염증을 유발하여 급성부종을 일으킨 다음 귀 두께를 측정하였다. 그 결과(Fig. 6), control과 비교했을 때 모든

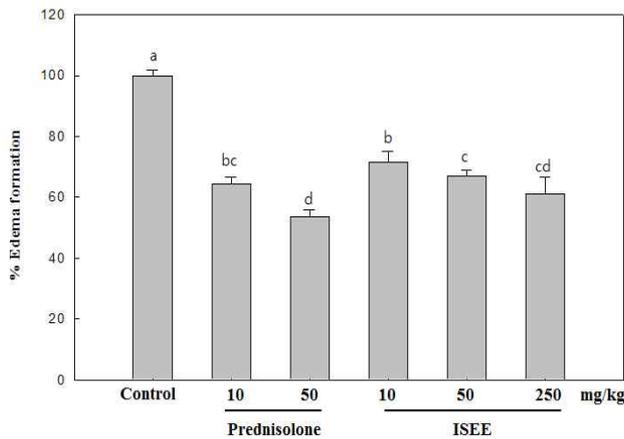


Fig. 6. Inhibition of *Ishige sinicola* ethanol extract (ISEE) on croton oil-induced mouse ear edema.

Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different ($p < 0.05$).

추출물의 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소한 것을 확인할 수 있다. 특히 뽕배 추출물의 250 mg/kg·body weight 처리구가 positive control인 prednisolone 10 mg/kg·body weight 처리구와 유사하게 감소한 것을 확인하였다. 또한 이는 조직 관찰 결과에서도 확인할 수 있으며, croton oil만을 처리한 경우에 비해 뽕배 추출물 처리구의 경피 및 진피 두께가 얇아진 것을 알 수 있었다(Fig. 7A). 또한 조직내 mast cell의 조직의 수를 관찰 한 결과(Fig. 7B) 뽕배 에탄올 추출물의 처리구가 염증반응에서 mast cell의 침윤을 억제한 것을 확인하였다.

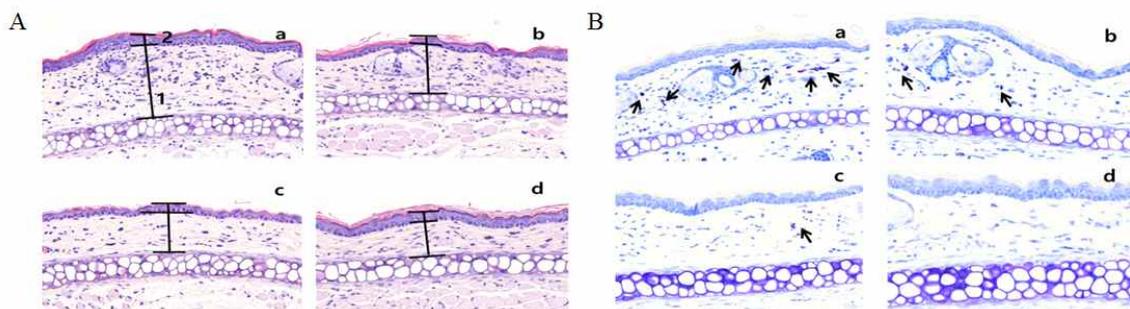


Fig. 7. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of 5% croton oil (v/v) in acetone (a-c) or vehicle acetone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (A) and toluidine-blue (B) examined under light microscopy (magnification: $\times 200$).

Treatments: vehicle 2% Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b), and *Ishige sinicola* (ISEE) 20 μ L/ear (c). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively and the arrows indicate mast cells.

요약

본 연구에서는 뽕배 에탄올 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS로 유도된 염증 반응 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 실시하였다. RAW 264.7 세포에

LPS와 함께 세포를 배양하였다. 먼저 MTT assay 실험을 통해 뽕배 에탄올 추출물이 모든 농도(0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL)에서 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인 하였다. 또한 모든 농도에서 염증억제 효과를 살펴 본 결과, LPS 처리구는 iNOS, COX-2, NF- κ B 그리고 MAPKs의 발현양을 증가시켰으나, 뽕배 에탄올 추출물의 경우 염증 반응에 관여하는 전사인자인 NF- κ B와 MAPKs의 활성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타내었다. 마지막으로 뽕배 에탄올 추출물의 mast cell의 피부 조직학적 변화를 알아본 결과, control의 경우 진피와 경피의 면적이 확장 되어있고, mast cell의 침윤이 정상 군에 비하여 현저하게 증가함을 알 수 있었다. 반면에 뽕배 에탄올 추출물의 경우 대조군에 비해 진피와 경피의 두께가 줄었으며 mast cell의 침윤감소에 효과가 있는 것을 확인하였다. 따라서 모든 결과를 종합하였을 때 뽕배 에탄올 추출물이 항염증 치료제 뿐만 아니라 더 나아가 항염증에 유용한 기능성 식품소재로서 가치가 높다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구 사업입니다(No. 2012RIA6A1028677).

References

1. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE (2007) Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. Clin Exp

- Immunol, 147, 227-253
2. Ljung T, Lundberg S, Varsanyi M, Ohansson C, Schmidt PT, Herulf M, Lundberg JO, Hellstrom PM (2006) Rectal nitric oxide as biomarker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus non-responder. *World J Gastroenterol*, 12, 3386-3392
 3. Wu MJ, Wang L, Ding HY, Weng CY, Yen JH (2004) *Glossogyne tenuifolia* acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by downregulating LPS-induced NF- κ B. *J Biomed Sci*, 11, 186-199
 4. Nathan CF (1987) Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*, 79, 319-326
 5. Jaffrey SR, Snyder SH (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 417-440
 6. Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 8, 837-848
 7. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C (1994) Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transpl Int*, 7, S647-S649
 8. Majdalawieh A, Ro HS (2010) Regulation of I κ B α function and NF- κ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflammation*, 2010, 1-27
 9. Yang H, Oh KH, Yoo YC (2015) Anti-inflammatory effect of hot water extract of aronia fruits in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 44, 7-13
 10. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrob Chemother*, 50, 889-893
 11. Ryu BH, Kim DS, Cho KJ, Sin DB (1989) Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J Food Sci Technol*, 21, 595-600
 12. Choo KS, Lee HN, Shin SA, Kim HJ, Park YS, Kim SK, Jung JY (2016) Induction of growth inhibition and apoptosis in human cancer cells by a brown algae extract. *J Life Sci*, 26, 555-562
 13. Cho BO, Ryu HW, So YK, Jin CH, Byun MW, Kim WG, Jeong IY (2012) *Ishige sinicola* extracts induce apoptosis via activation of a caspase cascade in Human hela cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 901-906
 14. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Kim JH, Park SH, Jang MR, Ahn DH (2016) Anti-inflammatory effect of *Chondrus nipponicus* yendo ethanol extract on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 45, 194-201
 15. Kim MJ, Bea NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Cho YJ, Ahn DH (2015) Anti-inflammatory effect of water extract from tuna heart on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 Cells. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J*, 30, 326-331
 16. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Choi JS, Ahn DH (2016) Anti-inflammatory effect of *Grateloupia imbricata* Holmes ethanol extract on LPS-induced RAW 264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 45, 181-187
 17. Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *MPMI*, 13, 1380-1384
 18. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H (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
 19. Szelenyi J (2001) Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull*, 54, 329-338
 20. Choi YS, Won JY, Yoo IW, Shin JW, Kim SJ, Sohn NW (2013) Effect of tetramethylpyrazine on pro-inflammatory cytokine expressions in mouse brain tissue following intracerebroventricular lipopolysaccharide treatment. *Korea J Herbol*, 28, 83-90
 21. Li Y, Wu Q, Deng Y, Lv H, Qiu J, Chi G, Feng H (2015) D(-)-Salicin inhibits the LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells and mouse models. *Int Immunopharmacol*, 26, 286-294
 22. Park, SH, Jeong JH, Park BJ, Jeong TH (2015) Anti-inflammatory effect of *Fallopia sachalinensis* RonseDecr. fruit. *J Soc Cosmet Sci Korea*, 41, 237-241
 23. Hinz B, Brune K (2002) Cyclooxygenase-2-10 years later. *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 367-375
 24. Kim SH, Yun JW, Lee YH, Cheon EJ (2009) Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha promoter gene in Kawasaki disease and relation to the risk of coronary artery lesion. *Korean J Pediatr*, 52, 476-480
 25. Kim DH, Hwang EY, Son JH (2013) Anti-inflammatory activity of *Carthamus tinctorious* seed extracts in RAW264.7 cells. *J Life Sci*, 23, 55-62
 26. Noh KH, Jang JH, Min KH, Chinzoring R, Lee MO, Song YS (2011) Suppressive effect of green tea seed coat ethyl acetate fraction on inflammation and its

- mechanism in RAW 264.7 macrophage cell. J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 625-634
27. Bak MJ, Jeong JH, Kang HS, Jin KS, Ok S, Jeong WS (2009) *Cedrela sinensis* leaves suppress oxidative stress and expressions of iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells. J Food Sci Nutr, 14, 269-276
 28. Kim BW, Kim JI, Kim HR, Byun DS (2014) Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoi* on lipopolysaccharides- stimulated RAW 264.7 Cells. Korean J Fish Aquat Sci, 47, 527-536
 29. Chung HJ, Lee HS, Shin JS, Lee SH, Park BM, Youn YS, Lee SK (2010) Modulation of acute and chronic inflammatory processes by a traditional medicine preparation GCSB-5 both *in vitro* and *in vivo* animal models. J Ethnopharmacol, 130, 450-459
 30. Eum WS, Lee KJ, Kim DW, Lim SS, Kang IJ, Park J, Choi SY (2013) Anti-inflammatory effects of extracts from *Caesalpinia sappan* L. on skin inflammation. J Korean Soc Food Sci Nutr, 42, 384-388
 31. Amin K (2012) The role of mast cells in allergic inflammation. Respir Med, 106, 9-14
 32. Rocca B, FitzGerald GA (2002) Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. Int Immunopharmacol, 2, 603-630
 33. Seo UK, Lee JI, Park JH, Park YK (2008) The ethyl acetate extract of north *Kangwhal* (*Ostericum koreanum*) attenuates the inflammatory responses in PMA/A23187-stimulated mast cells. Korea J Herbol, 23, 81-89