

## RAW 264.7 대식세포에서 유산균으로 발효한 다시마와 툃의 항염증 효과

황연지 · 채인숙 · 이윤경<sup>†</sup>

제주대학교 식품영양학과

### Anti-inflammatory Effects of Fermented *Laminaria japonica* and *Hizikia fusiforme* Water Extracts with Probiotics in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophage Cell Line

Yeon-ji Hwang, Insook Chae and Yunkyoung Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Nutrition, Jeju National University, Jeju, South Korea

#### ABSTRACT

This study was conducted to investigate alterations of seaweed composition upon *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) fermentation as well as potential anti-inflammatory effects and mechanism (s) of water extracts and fermented water extracts of *Laminaria japonica* (LJ) and *Hizikia fusiforme* (HF) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. Total polyphenol, total sugar, and reducing sugar contents were measured in LJ and HF water extracts before and after fermentation by LGG. Alterations of inflammatory cytokine levels in cell culture media were measured by ELISA, and levels of phosphorylation of c-jun NH2-terminalkinase (JNK) and extra cellular signal regulated kinase (ERK) were examined by Western blot analysis. LGG fermentation of LJ and HF altered total polyphenol and sugar contents in water extracts of LJ and HF. LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- $\alpha$  was significantly reduced by HF-f compared to control in RAW264.7 cells. Consistent with reduction of anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-6, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels by HF-f, HF-f also significantly reduced phosphorylation of ERK and JNK in LPS-stimulated RAW264.7 cells. In addition, LJ-f and HF also significantly reduced phosphorylation of JNK and ERK induced by LPS in RAW264.7 cells. Overall, our result suggests that HF-f among the four tested seaweed extracts is the most potent anti-inflammatory agent, and its mechanism of action is partially mediated by reduction of JNK and ERK phosphorylation as well as IL-6 and TNF- $\alpha$  production in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

Key words : *Laminaria japonica*, *Hizikia fusiforme*, anti-inflammation, LGG, RAW264.7

#### 서 론

염증 반응은 감염 및 다양한 외부 자극과 조직 손상에 의한 신체의 방어 반응으로, 손상된 신체 구조 및 기능을 재생하려는 기전이다(Lawrence T & Gilroy DW 2007). 정상적인 염증반응은 항염증성 단백질과 염증성 단백질 분비의 균형에 의해 조절되며, 이러한 조절 기전의 불균형으로 인해 과도한 염증성 물질이 생성되면 체내 조직의 손상을 일으키고, 만성염증으로 연계되어 동맥경화, 당뇨, 암과 같은 각종 만성염증성 질환의 발병을 초래하기도 한다(Baker RG 등 2011). 체내 면역반응 조절에 관여하는 대식세포(macrophages)는 외부로부터 침입한 이물질의 제거하고, 식균작용과 함께 interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  등의 사이토카인을 생성하여 생체 방어와 면역체계에서 필수적인 역할을

담당한다(Zhang G & Ghosh S 2000). 현재까지 개발·이용되고 있는 항염증제는 크게 스테로이드계와 비스테로이드계로 나뉘며, 모두 염증반응의 주요 매개체인 프로스타글란딘 합성의 억제를 통해서 그 효과를 발휘한다. 하지만 이들 항염증제는 신장, 심장 및 위장 질환의 유발과 같은 부작용으로 인체 안전성 면에서 문제점을 가지고 있어(Makins R & Ballinger A 2003; Dogne J 등 2006), 이러한 부작용을 최소화한 항염증제의 개발을 위해 천연물을 이용한 보다 안전한 항염증 치료제의 연구·개발이 활발히 진행되고 있다(Kang B 등 2014).

다시마(*Laminaria japonica*)와 툃(*Hizikia fusiforme*)은 우리나라의 해안에 전반적으로 분포하는 해조류로 갈조류과에 속하며, 건조품 기준으로 단백질은 약 10%, 탄수화물은 약 30~40%가 함유되어 있으며, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 인 등의 무기질뿐만 아니라, 비타민 B, 비타민 C과 비타민 E 등의 비타민 함량이 매우 풍부하다(Jiménez-Escrig A & Sánchez-Muniz F 2000; Gómez-Ordóñez E 등 2010), 특히 해조류가 함유하고 있는 탄수화물은 다당류로써 인간의 소화관계에서 소화되지

<sup>†</sup> Corresponding author : Yunkyoung Lee, Tel: +82-64-754-3555, Fax: +82-64-725-2539, E-mail: lyk1230@jejunu.ac.kr

않고 장까지 도달이 가능한 식이 섬유소로써의 건강증진 활성을 가진다(Deville C 등 2004). 다시마와 툫은 후코이단(fucoidan), 알긴산(alginate)과 라미나란(laminaran) 등과 같은 식이섬유를 다량 함유하고 있으며, 이들의 항산화(Chandini SK 등 2008; Eom S 등 2010; Lee NY 2013), 항비만(Maeda H 등 2007; Miyata M 등 2009), 항당뇨(Nwosu F 등 2011; Oh J 등 2016), 항염증(Park HY 등 2011; Kang B 등 2014) 효과 등의 다양한 생리활성 효과가 보고되어 있다. 또한 최근에는 유산균을 이용한 발효를 통해 해조류 추출물의 프리바이오틱스(prebiotics)로 이용될 수 있음이 보고되었으며, 유용 미생물을 이용한 발효과정이 새로운 생리활성 물질의 생성 및 유용성분의 증대에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(O'Sullivan L 등 2010; Lee W 등 2016).

발효는 고분자의 유기물질을 대사하여 상대적으로 단순한 물질로 변환시키는 생화학적 반응으로, 식품의 영양을 증진, 단백질의 질과 섬유질의 소화성을 향상과 체내 흡수율을 개선하는 등 식품의 영양학적 특성 및 기능성 향상에 매우 중요한 역할을 한다(Kim Y 등 1993; Chen I 등 2009). 유산균은 장내 유해균 억제 및 정장작용 효과가 있는 프로바이오틱스(probiotics)로 *Lactobacillus* 속과 *Bifidobacteria* 속이 대표적이고, 이들은 식품의 당류를 발효하여 주로 젖산을 생성하며, 유가공품과 김치, 간장, 된장 등에서 풍미를 향상시키고, 장내 유익한 작용을 하는 것으로 알려져 있어 오랫동안 산업적으로 이용되어 왔다(Gomes AM & Malcata FX 1999; Shah N 2000). 해조류의 탄수화물은 대부분이 체내에서 소화되기 어려운 난소화성 다당류로 산이나 알칼리에 비교적 안정적인 특징이 있어 효율적으로 추출하기 어려울 뿐만 아니라, 활성 물질의 변질 및 손실을 줄 수 있는 가능성이 높다는 단점이 있으나(Shon JH 등 2006), 이러한 단점을 보완하기 위해 최근 미생물 효소를 통하여 해조류의 유용성분을 추출해 내고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Eom S 등 2010; Eom S 등 2011).

이에 본 연구에서는 다시마와 툫의 물 추출물과 장내 대표적인 유산균(*Lactobacillus rhamnosus GG*; LGG)으로 발효한 다시마와 툫의 물 추출물의 성분 차이를 비교하고, 이들 추출물이 LPS(lipopolysaccharide)로 염증반응을 유도한 RAW-264.7 대식세포의 염증반응에 미치는 잠재적인 항염증 활성 효과와 그 기전을 비교·분석하였다.

## 연구 방법

### 1. 시료준비

실험에 사용된 툫은 제주 전통오일시장에서 국내산 생물을 구입하였고, 다시마는 완도쇼핑에서 국내산 염장다시마

를 구입하여 Fig. 1의 과정을 통해 시료를 제작하였다. 다시마와 툫은 수세, 제염, 동결건조의 과정을 거쳐 분말화 한 뒤, 시료무게 60배량(w/v)의 3차 증류수를 첨가하여 24시간 동안 추출하였다. 추출 후 감압여과한 후, 감압농축기(Heidolph, Schwabach, Germany)를 이용하여 65°C에서 농축 후 동결 건조하여 분말화 하였다(Oh J 등 2016). 다시마(*Laminaria japonica*; LJ)와 툫(*Hizikia fusiforme*; HF) 물 추출물은 위에서 준비한 해조류 분말을 농도별로 DPBS(Dulbecco's Phosphate buffered saline)에 희석하여 여과한 후, 실험에 사용하였다. 다시마와 해조류 추출물의 발효 조건을 최적화하기 위해 시험 발효를 시간, 온도, LGG의 농도별로 진행하였으며, 최종

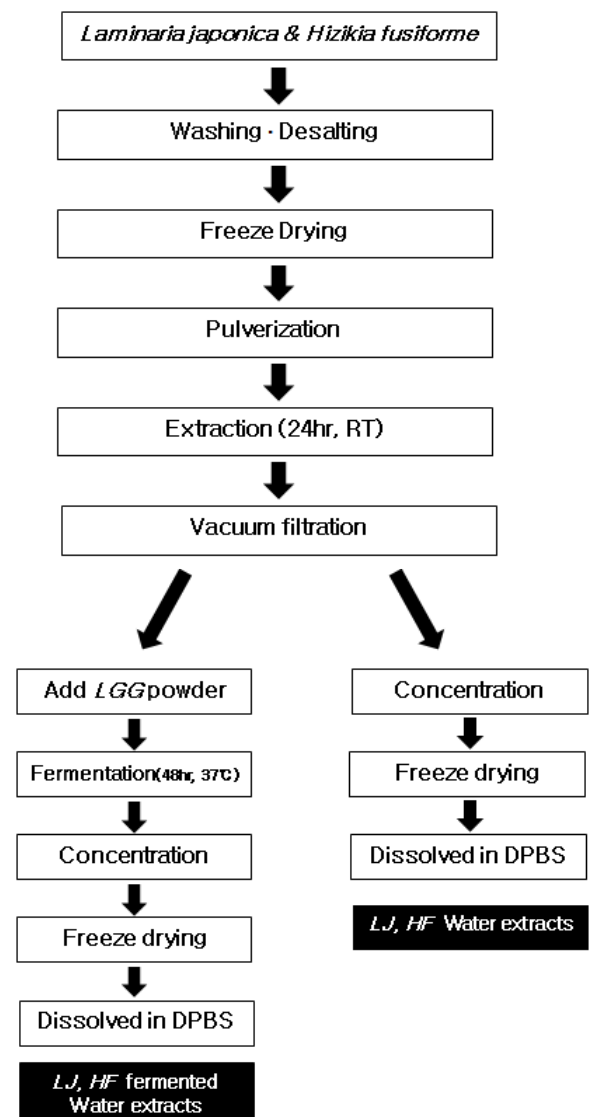


Fig. 1. A flow diagram for preparation of *Laminaria japonica* and *Hizikia fusiforme* water extracts and their fermented water extracts.

적으로 다시마와 톳의 발효 물 추출물(LJ-f, HF-f)의 경우, 분리된 다시마와 톳의 물 추출물에 LGG(300 billion CFU/g, Chr-Hansen, Denmark, 매일유업(주) 중앙연구소에서 제공) powder를 2 g/100 mL(w/v) 농도로 첨가하여 37°C 배양기에서 48시간 동안 발효를 진행한 후 (pH가 4.0 이하), 고압멸균 처리를 통해 발효를 종료하였다. 그 후 LJ-f와 HF-f를 감압농축기를 이용하여 65°C에서 농축 후, 동결 건조하여 분말 형태의 시료를 제작하였다. 실험에 사용한 해조류 물 추출물과 발효 물 추출물은 농도별로 DPBS에 희석·여과한 후 사용하였다(Fig. 1).

## 2. 총 폴리페놀과 당 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 응용하여 측정하였다(Folin O & Denis W 1912). 시료 50 µL에 동량의 1 M Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 실온에서 6분간 반응시킨 후, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 100 µL를 가하여 30분간 반응시켜 720 nm에서 흡광도(Molecular device, CA, USA)를 측정하였다. 지표 물질인 galic(gallic) acid의 표준검량곡선을 통해 시료가 함유하는 폴리페놀 화합물의 함량을 측정하였다. Phenol-sulfuric acid 법을 응용하여 시료의 총 당 함량(total sugar)을 측정하였으며(Wolfrom ML & BeMiller JN 1963), 시료 10 µL에 5% phenol 용액 10 µL를 첨가한 후 50 µL의 황산을 가하여 반응시켜, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. D-Glucose 표준용액을 이용한 표준검량곡선을 통해 총 당 함량을 계산하였다. 시료의 환원당(reducing sugar) 함량은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 응용하여 측정하였으며, D-glucose 표준용액을 이용한 표준검량곡선을 통해 환원당 함량을 측정하였다(Miller GL 1959).

## 3. 세포배양

RAW264.7 대식세포는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며, 10% heat inactivated fetal bovine serum(HI-FBS), 1% antibiotics(penicillin-streptomycin)와 1% L-glutamine을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. Seeding 후에는 serum을 줄인 배지인 1% HI-FBS를 포함한 DMEM 배지에서 약 24시간 배양하여 세포주기를 균일하게 맞추어 실험에 사용하였다. 세포실험에 사용된 모든 시약은 Gibco(BRL, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다.

## 4. 염증관련 단백질 발현 측정

RAW264.7 대식세포를 1×10<sup>6</sup> cells/well의 농도로 6-well plate에 분주한 뒤 1% HI-FBS를 함유한 DMEM에서 24시간 동안 배양하였다. 다시마와 톳 물 추출물의 처리 농도는 선

행연구(Oh & Lee 2015)에서 3T3-L1 전지방세포에 다시마와 톳 추출물을 처리하여 실시된 세포독성 실험결과, 다시마와 톳 모두 200 µg/mL까지는 세포생존율에 영향을 미치지 않는다는 결과와 LJ와 HF 추출물을 농도별로 RAW264.7 세포주에 다시마뿌리 추출물의 경우에는 100 µg/mL까지, 톳과 톳 발효추출물(발효균주: *Weissella* sp. SH-1, *Lactobacillus casei*)의 경우에는 500 µg/mL까지 처리하였을 때 독성이 관찰되지 않았던 세포생존율 결과를 고찰하여, 본 연구에서는 LJ와 HF 추출물과 이들의 발효 추출물의 처리농도를 100 µg/mL로 설정하였다(Kang B 등 2014; Kwon MS 등 2015). LJ, HF, LJ-f 혹은 HF-f를 100 µg/mL 농도로 처리하고, 3시간 후 LPS(200 ng/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 처리가 끝난 세포는 DPBS로 세척한 후 lysis buffer(100 µL)를 이용하여 단백질을 추출하였으며, 단백질 샘플은 분석이 진행되기 전까지 -70°C에 보관하였다. 본 실험에 사용된 단백질 정량과 western blot assay 방법은 Hwang YJ(2016)에 자세히 기술되어 있으며, 간단히 언급하면 다음과 같다. Bradford 법으로 단백질 정량을 실시한 후, 10% SDS-PAGE gel에 50 µg의 단백질을 로딩하여 80 V에서 1시간, 120 V에서 1시간동안 전기영동을 실시하고, nitrocellulose blotting membrane(Amersham Co., Germany)으로 transfer시켰다. 한 시간 동안 5% blocking buffer(Bio-rad, CA, USA)로 blocking을 한 후, 1차 항체(p-JNK, JNK, p-ERK, ERK(Cell signalling technology, MA, USA))를 5% blocking buffer에 1:1,000의 농도로 희석하여 4°C에서 12~24시간 동안 반응시켰다. TBS-T 용액(0.1% Tween 20를 함유한 TBS)을 이용하여 10분씩, 3회 세척한 후 2차 항체 anti-rabbit IgG, HRP-linked 항체(Cell signalling technology, MA, USA)를 5% blocking buffer에 1:2,000의 농도로 희석하여 상온에서 90분 동안 반응시켰다. 마지막으로 TBS-T 용액을 이용하여 3회 washing한 후, ECL kit(Enhanced chemiluminescence, Cyanogen, Bologna, Italy)를 이용하여 Fusion Solo (Marne, France)를 통해 측정하였다.

## 5. 염증관련 사이토카인 생성량 측정

다시마와 톳의 물 추출물(LJ, HF)과 발효물 추출물(LJ-f, HF-f)이 LPS의 자극에 의해 생성되는 IL-1β, IL-6과 TNF-α의 생성량에 미치는 효과를 측정하기 위하여 RAW264.7 대식세포를 1×10<sup>6</sup> cells/well의 농도로 6-well plate에 분주한 뒤 1% HI-FBS를 함유한 DMEM에서 약 24시간 동안 배양하였다. 4가지 추출물 시료를 각각 처리하고, 3시간 뒤 LPS(200 ng/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양 후, 세포 배양액을 수거하여 원심분리 과정을 거친 상등액을 분석이 실시될 때까지 -70°C에 보관하였다. 배지의 사이토카인 농도 측정은 ELISA kit(IL-1β는 R&D system, Minneapolis, MN, USA/IL-6)와

TNF- $\alpha$ 는 BD PharMingen(San Diego, CA, USA)를 이용하여 제공된 실험방법에 따라 진행하였으며, 흡광도는 450과 540 nm에서 microplate reader(Molecular device, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 6. 통계분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(SEM)로 표시하였으며, 유의적 차이에 대한 해석은 *t*-test 혹은 ANOVA 분석을 실시하였다. 유의성 차이 검증은 *p*-value<0.05 수준에서 실시하였고, 사후검정은 Tukey test를 사용하였다(Graph pad Prism Version 6.0, San Diego, CA, USA).

## 결과 및 고찰

### 1. 발효에 따른 다시마와 톳의 이화학적 변화

발효 전과 후의 총 폴리페놀 함량과 총 당·환원당 함량의 측정 결과는 Table 1과 같다. 다시마(*LJ*)와 톳(*HF*) 물 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 6.44  $\mu$ g/mL, 2.57  $\mu$ g/mL로, *HF*의 폴리페놀 함량이 *LJ*의 폴리페놀 함량보다 유의적으로 높았다. *LGG* 발효에 의해 두 해조류 추출물의 총 폴리페놀 함량은 감소하였다. 즉, *LJ*의 폴리페놀 수치는 2.57  $\mu$ g/mL에서 발효 후 1.83  $\mu$ g/mL로 약 28% 감소하였고, *HF*의 폴리페놀 수치는 6.44  $\mu$ g/mL에서 발효 후 2.30  $\mu$ g/mL로 약 64%의 유의적인 감소를 나타냈다(*p*<0.001).

본 연구에서는 다시마와 톳의 총 폴리페놀 함량이 *LGG*를 이용한 발효과정을 통하여 감소하였는데, 이와 같이 발효 후의 폴리페놀 함량의 감소는 Lee S 등(2010)의 연구에서 야콘

뿌리의 폴리페놀 함량이 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용한 상온 정치발효에 의해 148.6  $\mu$ g/mL에서 89.7  $\mu$ g/mL로 감소하는 결과에서도 관찰되었으나, 시료와 발효 균주 및 발효조건 등이 다르므로 직접적인 비교가 어렵다. 추가적으로 Friedman과 Jürgens(2000)의 연구에 의하면 페놀산 중에는 pH에 의해 민감하게 반응하여 변형이 일어나는 페놀산과 반대로 열과 낮은 pH에서도 비교적 안정적인 페놀산이 존재하며, 본 연구에서 관찰된 총 폴리페놀 함량의 변화에도 발효 종료 시점의 pH(4 이하)가 일정부분 영향을 미친 것으로 추측되나, 정확한 결론의 도출을 위해서는 pH에 민감도에 따른 다양한 종류의 폴리페놀 측정이 필요하겠다. 한편, 본 연구결과와는 반대로 누룩곰팡이인 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 다시마 물 추출물을 발효하였을 때, 총 폴리페놀의 수치 증가와 더불어 항산화 능력 또한 증가시켰다는 보고가 있다(Bae H & Kim Y 2010). 이 또한 두 연구에서 사용된 발효 균주와 발효 조건 등의 차이 등으로 직접적인 비교가 어렵다는 제한점을 가진다.

발효에 따른 다시마와 톳 추출물의 총 당량과 환원당 함량의 변화결과, *LJ*의 총 당 함량은 3.74  $\mu$ g/mL, *LJ*-f는 5.96  $\mu$ g/mL로 발효 후 총 당 함량이 증가하는 경향을 보였으며, *HF*의 총 당 함량은 2.26  $\mu$ g/mL, *HF*-f는 11.89  $\mu$ g/mL로 발효 후 총 당의 함량이 유의적으로 증가하였다. 환원당 함량을 비교한 결과에서는 다시마와 톳 추출물의 환원당 함량이 *LGG* 발효를 통해 유의적으로 높아진 것을 관찰하였다. 즉, 발효 전 *LJ*와 *HF*의 환원당 함량은 각각 4.56  $\mu$ g/mL, 12.33  $\mu$ g/mL이었으나, 발효 후 *LJ*-f와 *HF*-f의 환원당 함량은 각각 226.78  $\mu$ g/mL, 309.00  $\mu$ g/mL로, 발효를 통해 다시마와 톳 물 추출물의 환원당 함량이 유의적으로 증가하였다(*p*<0.001). Rhee C 등(2006)의 재래식 된장의 발효과정 중 이화학적 특성의 변화에 대한 연구결과에 의하면 환원당 함량은 숙성 60일까지 6.36%의 증가를 보였는데, 이는 amylase의 활성증가로 인해 환원당이 증가한 것으로 해석하였다. 하지만 본 연구의 다시마와 톳 추출물의 발효에서도 이와 같은 amylase의 활성 증가가 영향 여부 확인은 추가적인 분석이 필요하겠다.

### 2. 다시마와 톳 추출물이 RAW264.7 대식세포의 염증 관련 단백질 발현에 미치는 영향

염증성 신호전달계 단백질인 ERK와 JNK의 인산화 정도를 통해 4종의 다시마와 톳 추출물이 LPS로 염증 유도된 RAW264.7 대식세포의 염증성 단백질 발현에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. LPS 자극으로 증가한 ERK의 인산화는 3종의 해조류 처치(LPS+*LJ*-f, LPS+*HF*와 LPS+*HF*-f)에 의해 유의적으로 감소하였고(*p*<0.05), JNK의 인산화는 LPS+*HF*와 LPS+*HF*-f군에서 유의적인 감소를 나타냈다(*p*<0.05).

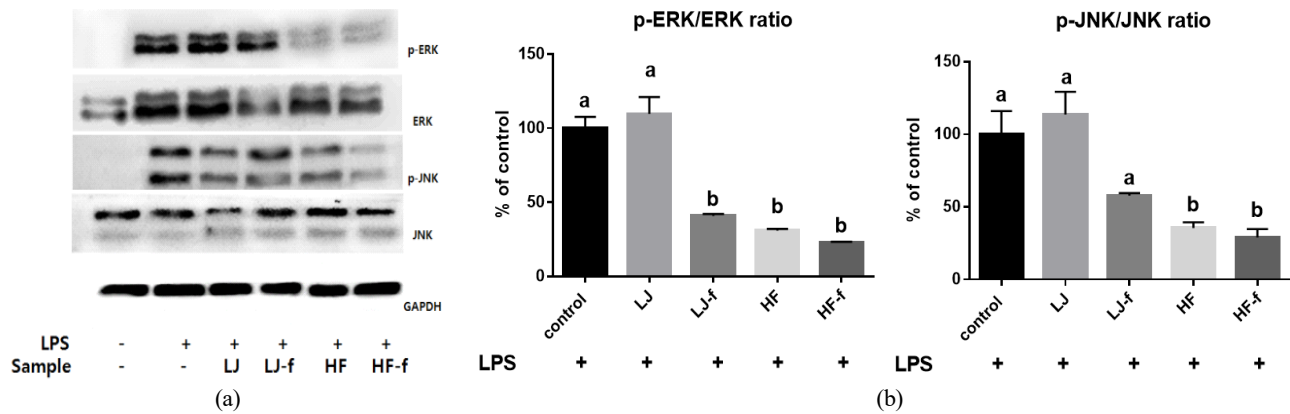
**Table 1. Total polyphenol, total sugar and reducing sugar contents of *LJ* and *HF* water extracts and fermented water extracts**

Sample	Total polyphenol contents ( $\mu$ g/mL)	Total sugar contents ( $\mu$ g/mL)	Reducing sugar contents ( $\mu$ g/mL)
<i>LJ</i>	2.57 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	3.74 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	4.56 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>
<i>LJ</i> -f	1.83 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	5.96 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	226.78 $\pm$ 2.22 <sup>b</sup>
<i>HF</i>	6.44 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.26 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	12.33 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>
<i>HF</i> -f	2.30 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	11.89 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>	309.00 $\pm$ 3.85 <sup>b</sup>

\* Values are the means $\pm$ SEM of three independent experiments (n=3).

\* Values that do not share the same superscript are significantly different by ANOVA (*p*<0.05).

\* Abbreviations: *LJ* (*Laminaria japonica* water extract), *LJ*-f (fermented *Laminaria japonica* water extract), *HF* (*Hizikia fusiforme* water extract), *HF*-f (fermented *Hizikia fusiforme* water extract).



**Fig. 2. Effects of LJ, HF, LJ-f, and HF-f on phosphorylation of ERK and JNK in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages.**

\* Values are the means $\pm$ SEM of three independent experiments.

\* Values that do not share the same superscript are significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

\* Abbreviations: LJ (*Laminaria japonica* water extract), LJ-f (fermented *Laminaria japonica* water extract), HF (*Hizikia fusiforme* water extract), HF-f (fermented *Hizikia fusiforme* water extract); RAW264.7 cells were incubated in serum starved media for 24 hrs and then treated with 100  $\mu$ M of the extracts mentioned above for 3 hrs prior to treating LPS (200 ng/mL) for an additional 24 hrs.

전사인자 NF- $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B)는 만성 염증성 질환 유발 인자로써 염증 관련 유전자 발현의 조절을 통해서 면역력을 촉진하며(Baker RG 등 2011), NF- $\kappa$ B는 여러 염증관련 단백질(예, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) 혹은 LPS 등의 내독소(endotoxin)에 의해 그 생성이 촉진된다(Anisowicz A 등 1991). MAPK (mitogen-activated protein kinase)는 세포내 효소로 I $\kappa$ B의 인산화 조절을 통하여 만성염증성 질환유발 인자인 NF- $\kappa$ B의 활성화에 관여한다(Baker RG 등 2011; Wada T & Penninger JM 2004). MAPK 경로는 유전자의 발현, 세포의 생존, 분화, 증식 및 사멸 등에 관여하며, 이 경로에는 ERK(extracellular signal regulated kinase), JNK(c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase), 그리고 p-38 MAPK 등이 포함된다(Baker RG 등 2011). 본 연구에서는 LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포의 ERK와 JNK의 인산화 감소 정도를 통해 다시마와 톳 추출물 4종의 항염증 효과와 그 잠재적인 기전을 살펴보았으며, HF와 HF-f의 추출물은 LPS로 증가한 ERK와 JNK의 인산화를 감소시켰고, LJ-f는 ERK의 인산화를 감소시켰다. 즉, 톳의 경우에는 HF와 HF-f의 염증관련 단백질의 활성을 감소능에 유의적인 차이가 없었으나, 다시마의 경우에는 LJ-f군만이 ERK의 인산화를 감소시켜 LJ와 LJ-f간의 ERK 인산화 감소정도에 차이를 관찰하였다. 이와 같이 발효를 통한 기존의 생리활성의 증대 혹은 개선효과는 타 연구에서도 발표된 바 있는데, Eom S 등(2010)의 연구에 의하면 다시마 효모 발효 추출액은 다시마 추출액과 비교하여 항염증과 항산화 능력이 향상됨을 보여주었다.

### 3. 다시마와 톳 추출물이 RAW264.7 대식세포의 염증 관련 사이토카인 생성에 미치는 영향

LJ, HF, LJ-f, HF-f가 LPS의 자극으로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에서 생성하는 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 생성에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 2와 같다. LPS 자극에 의해 RAW264.7 대식세포의 염증관련 사이토카인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 수치는 LPS를 처리하지 않은 대조군(negative control)에 비해 유의적으로 증가하였으며, 4종의 해조류 추출물 중, LPS+HF-f군만이 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 수치를 LPS군에 비해 유의적으로 감소시켰다( $p < 0.05$ ). 사이토카인 IL-1 $\beta$ , IL-6과 TNF- $\alpha$  등은 염증반응을 촉진하는 매개체로써, 면역세포 활성화를 통한 염증반응 조절, 체내의 조절작용뿐만 아니라, 선천적 면역반응과 만성염증반응에 관여한다(Ren K & Torres R 2009; Ishihara K & Hirano T 2002). 본 연구에서 톳 발효 추출물(HF-f)은 LPS의 자극으로 생성·분비가 증가한 IL-1 $\beta$ 의 수치에는 영향을 주지 않았으나, IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 LPS 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰다. Kang B 등(2014)의 연구에 의하면 다시마 뿌리 에탄올 추출물은 LPS로 염증 유도된 RAW264.7 세포에서 생산이 증가된 IL-1 $\beta$ , IL-6와 TNF- $\alpha$  수치를 모두 유의적으로 낮추어 본 연구와는 상이한 결과를 보였다. 하지만 일반 다시마와 다시마 뿌리부분의 잠재적인 성분 차이, 사용된 추출용매, 해조류 추출과정의 차이 및 LPS로 염증유도 처리시간이 상이함 등 본 연구와 직접적인 비교의 한계가 있고 제한점이 있으며, 이러한 요소들이 상이한 결과의 부분적인 이유로 작용한다고 사료된다. 상당수의 연구결과들에서 갈조류 유래 다당류인 후코이단(fucoidan)을 이용한 다양한 항염증 효과가 보고된바 있는데, Park HY 등(2011)의 연구에서는 LPS로 염증 유도한 소신경교세포(microglia cells)에 후코이단을 처리하였을 때 농도 의존적으로 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 생성을 감

**Table 2. Effects of LJ, LJ-f, HF and HF-f on cytokine productions in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages**

Sample	IL-1 $\beta$ level ( $\mu$ g/mL)	IL-6 level ( $\mu$ g/mL)	TNF- $\alpha$ level ( $\mu$ g/mL)
Negative control	-	ND*	ND
Positive control	+	182.25 $\pm$ 32.75	1,170.12 $\pm$ 9.08 <sup>b</sup>
LJ	+	155.75 $\pm$ 19.25	1,195.81 $\pm$ 5.69 <sup>b</sup>
LJ-f	+	216.00 $\pm$ 54.00	1,190.11 $\pm$ 4.41 <sup>b</sup>
HF	+	209.25 $\pm$ 34.92	1,216.28 $\pm$ 3.39 <sup>b</sup>
HF-f	+	172.58 $\pm$ 3.75	1,071.84 $\pm$ 7.75 <sup>a</sup>

\* Values are the means $\pm$ SEM of three independent experiments (n=3).

\* Values that do not share the same superscript are significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

\* ND: Not detected.

\* Abbreviations: LJ (*Laminaria japonica* water extract), LJ-f (fermented *Laminaria japonica* water extract), HF (*Hizikia fusiforme* water extract), HF-f (fermented *Hizikia fusiforme* water extract); RAW264.7 cells were incubated in serum starved media for 24 hrs and then treated with 100  $\mu$ M of the extracts mentioned above for 3 hrs prior to treating LPS (200 ng/mL) for an additional 24 hrs.

소시켰다. 본 연구에서 사용한 LJ와 HF 추출물 여러 가지 성분을 함유하고 있는 추출물의 효과를 관찰한 반면, 후코이단 단일 성분의 항염증 효과를 관찰하는 등의 차이가 존재한다.

## 요약 및 결론

본 연구는 다시마와 톳 물 추출물(LJ, HF)과 유산균 LGG를 이용하여 발효한 다시마와 톳 물 추출물(LJ-f, HF-f)의 발효를 통한 성분의 변화를 분석하고, 이들의 잠재적인 항염증 활성과 그 기전을 살펴보았다. LGG를 이용한 발효과정 후, HF의 총 폴리페놀 함량은 발효 전과 비교하여 유의적으로 감소하였고, 총당 함량은 유의적으로 증가하였다. 반면, 환원당의 함량은 LJ와 HF 모두 발효 후에 유의적으로 증가하였다. 4종의 추출물 중에서 LJ를 제외한 LJ-f, HF 그리고 HF-f는 모두 염증으로 인해 활성이 증가한 ERK와 JNK의 인산화 수치를 유의적으로 감소시켜 MAPK pathway 단백질의 조절에 3종의 해조류 추출물이 영향을 미치는 것을 확인하였으나, LPS 자극을 통해 증가된 염증성 사이토카인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 는 HF-f 처치군에서만 유의적으로 그 수치가 감소하여 염증

성 신호전달 단백질의 활성 감소가 염증성 사이토카인 분비의 조절에 동일하게 영향을 주지는 않는 것으로 관찰되었다. 더불어 발효를 통한 다시마 물 추출물은 대식세포에서 LPS로 증가한 ERK와 JNK의 활성을 유의적으로 감소시켰으나, 톳의 경우에는 이러한 발효에 따른 추출물의 활성 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 RAW264.7 대식세포에서 LJ-f, HF, HF-f가 염증신호전달 관련 단백질인 ERK와 JNK의 인산화를 통한 잠재적 항염증 효과를 가지며, 그 중 HF-f는 염증성 사이토카인의 생성을 감소 효과가 있음을 확인하였다. 이와 같은 다시마와 톳의 항염증 활성은 부분적으로 MAPK pathway 단백질의 활성을 통해서 가능할 것이라 사료되지만, 추후 좀 더 넓은 스펙트럼의 사이토카인의 비교 분석과 추가적인 염증관련 단백질의 발현의 조절 등을 포함으로써 보다 정확한 다시마와 톳 추출물의 항염증 기전에 대한 이해를 높일 수 있을 것이라 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 2016년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Anisowicz A, Messineo M, Lee SW, Sager R (1991) An NF- $\kappa$ B-like transcription factor mediates IL-1/TNF- $\alpha$  induction of Gro in human fibroblasts. *J Immunol* 147: 520-527.
- Bae H, Kim Y (2010) Improvement of the functional qualities of sea tangle extract through fermentation by *Aspergillus oryzae*. *Fisheries Aquatic Scis* 13: 12-17.
- Baker RG, Hayden MS, Ghosh S (2011) NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Met* 13: 11-22.
- Chandini SK, Ganesan P, Bhaskar N (2008) *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem* 107: 707-713.
- Chen I, Ng C, Wang C, Chang T (2009) Lactic fermentation and antioxidant activity of Zingiberaceae plants in Taiwan. *Int J Food Sci Nutr* 60: 57-66.
- Deville C, Damas J, Forget P, Dandriofosse G, Peulen O (2004) Laminarin in the dietary fibre concept. *J Sci Food Agric* 84: 1030-1038.
- Dogne J, Hanson J, Supuran C, Pratico D (2006) Coxibs and cardiovascular side-effects: From light to shadow. *Curr Pharm Des* 12: 971-975.

- Eom S, Kang Y, Park J, Yu D, Jeong E, Lee M, Kim Y (2011) Enhancement of polyphenol content and antioxidant activity of brown alga *Eisenia bicyclis* extract by microbial fermentation. *Fisheries Aquatic Sci* 14: 192-197.
- Eom S, Lee B, Kim Y (2010) Effect of yeast fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of sea tangle water extract. *Korean J Fisheries Aquatic Sci* 43: 117-124.
- Folin O, Denis, W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12(2): 239-243.
- Gomes AM, Malcata FX (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol* 10: 139-157.
- Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A, Rupérez P (2010) Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Res Int* 43: 2289-2294.
- Hwang YJ (2016) Anti-inflammatory effect and its mechanism (s) of *Laminaria japonica* and *Hizikia fusiforme* fermented extracts by *Lactobacillus rhamnosus* GG. MS Thesis, Jeju National University. Jeju. pp 19-20.
- Ishihara K, Hirano T (2002) IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 357-368.
- Jiménez-Escrig A, Sánchez-Muniz F (2000) Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res* 20: 585-598.
- Kang B, Kim K, Kim M, Bark S, Pak W, Kim B, Ahn N, Choi Y, Ahn D (2014) Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *Korean J Food Sci Tech* 46: 729-733.
- Kim Y, Shin D, Jeong M, Oh H, Kang T (1993) Changes in quality characteristics of traditional *Kochujang* during fermentation. *Korean J Food Sci Tech* 25: 724-729.
- Kwon MS, Mun OJ, Bae MJ, Lee SG, Kim M, Lee SH, Yu KH, Kim YY, Kong CS (2015) Anti-inflammatory activity of ethanol extracts from *Hizikia fusiformis* fermented with lactic acid bacteria in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44:1450-1457.
- Lawrence T, Gilroy DW (2007) Chronic inflammation: A failure of resolution? *Int J Exp Pathol* 88: 85-94.
- Lee NY (2013) Antioxidant effect and tyrosinase inhibition activity of seaweeds ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1893-1898.
- Lee W, Oh JY, Kim E, Kang N, Kim K, Ahn G, Jeon Y (2016) A prebiotic role of *Ecklonia cava* improves the mortality of edwardsiellatarda-infected zebrafish models via regulating the growth of lactic acid bacteria and pathogen bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 54: 620-628.
- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K (2007) Effect of medium-chain triacylglycerols on anti-obesity effect of fucoxanthin. *J Oleo Sci* 56: 615-621.
- Makins R, Ballinger A (2003) Gastrointestinal side effects of drugs. *Exp Opin Drug Safety* 2: 421-429.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Miyata M, Koyama T, Kamitani T, Toda T, Yazawa K (2009) Anti-obesity effect on rodents of the traditional Japanese food, tororokombu, shaved *Laminaria*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 2326-2328.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Nwosu F, Morris J, Lund VA, Stewart D, Ross HA, McDougall GJ (2011) Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chem* 126: 1006-1012.
- O'Sullivan L, Murphy B, McLoughlin P, Duggan P, Lawlor PG, Hughes H, Gardiner GE (2010) Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine Drugs* 8: 2038-2064.
- Oh J, Lee Y (2015) Effects of water and ethanol extracts from four types of domestic seaweeds on cell differentiation in 3T3-L1 cell line. *J East Asian Soc Dietary Life* 25: 990-998.
- Oh J, Kim J, Lee Y (2016) Anti-inflammatory and anti-diabetic effects of brown seaweeds in high-fat diet-induced obese mice. *Nutr Res Prac* 10: 42-48.
- Park HY, Han MH, Park C, Jin C, Kim G, Choi I, Kim ND, Nam T, Kwon TK, Choi YH (2011) Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- $\kappa$ B, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food Chem Tox* 49: 1745-1752.
- Ren K, Torres R (2009) Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation. *Brain Res Rev* 60: 57-64.
- Shah N (2000) Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83: 894-907.

- Shon JH, Kang DY, Oh HC, Jung BM, Kim MH, Shin MO, Bae SJ (2006) The effects on antimicrobial and cytotoxicity of *Hijikia Fusiformis* fraction. Korean J Nutr 39: 444-450.
- Wada T, Penninger JM (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 23: 2838-2849.
- Wolfson ML, BeMiller JN (1963) Methods in Carbohydrate Chemistry: Reactions of Carbohydrates. Academic Press.
- Zhang G, Ghosh S (2000) Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through toll-like receptors. J Endotoxin Res 6: 453-457.
- 

Date Received Aug. 18, 2016

Date Revised Feb. 14, 2017

Date Accepted Feb. 17, 2017