



다시마 추출물의 항산화와 염증 조절 효과

최가미¹ · 김은영¹ · Zhang Guiguo² · 이윤경^{1,3,*}

¹제주대학교 식품영양학과, 한-중 식품유래 기능성 다당류 공동 연구개발센터,
²산동농업대학교 동물영양학과, 중-한 식품유래 기능성 다당류 공동 연구개발센터,
³제주대학교 차세대융복합과학기술협동과정

Antioxidant and Immunomodulatory Effects of *Laminaria japonica* Water Extract

Jiamei Cui¹, Eunyoung Kim¹, Guiguo Zhang², Yunkyoung Lee^{1,3,*}

¹Department of Food Science and Nutrition, and Korea-China Joint R&D center on Plant-derived polysaccharide, Jeju National University
²College of Animal Science and Technology, and Korea-China Joint R&D center on Plant-derived polysaccharide,
Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Shandong Agricultural University
³Interdisciplinary Graduate Program in Advanced Convergence Technology & Science, Jeju National University

Abstract

Laminaria japonica is a type of brown algae widely consumed in Asian countries and contains many essential nutrients and exhibits anti-obesity, antioxidant, and anti-inflammatory effects. In this study, the antioxidant and immunomodulatory effects of a *Laminaria japonica* water extract (LJE) were investigated using an *in vitro* model. Mean total polyphenol content of LJE was 2.16±0.11 µg GAE/mg, and LJE dose-dependently inhibited ABTS radical activity but did not scavenge DPPH radicals. In addition, LJE enhanced nitric oxide (NO) production and upregulated the mRNA expressions of proinflammatory cytokines (i.e., tumor necrosis factor- α and interleukin-6) in RAW 264.7 cells. On the other hand, LJE inhibited NO production and downregulated proinflammatory cytokine mRNA levels in endotoxin-stimulated RAW 264.7 cells. Thus, our data show that LJE has moderate antioxidant activity and biphasic immunomodulatory effects on RAW 264.7 cells. In summary, the study indicates that LJE has potential therapeutic use as a novel biphasic immuno-modulator.

Key Words : *Laminaria japonica*, extract, antioxidant, immunomodulatory, anti-inflammatory effect

1. 서 론

아시아 일부 국가들에서 식용으로 섭취되는 해조류의 다양한 건강증진 효과들이 보고되고 있다. 그 중 갈조류인 다시마(*Laminaria japonica*, LJ)는 저열량 식품으로 비타민, 미네랄, 식이 섬유 등이 풍부하며, 식품 첨가물, 동물의 사료, 비료, 화장품의 원료 등으로 적용되고 있다(Yoo & Lee 2004). 예로부터 다시마는 중국 전통 약제로써 부종, 요오드 결핍 질환, 위 질환 등에 대한 치료효과가 알려져 있으며(Li et al. 2022), 세포 및 동물실험을 통해 다시마의 항산화(Kim et al. 2011), 항염증(Lin et al. 2016), 항비만(Oh & Lee 2015), 항당뇨(Cho & Bang 2004), 암세포의 증식 저감 효과(Zhu et al. 2016)와 고지혈증의 개선 효과(Kim et al. 2002) 등 다양한 건강증진 효과들이 보고되었다.

천연물로부터 다양한 생리활성 성분을 추출하기 위한 다

양한 추출방법이 연구되어 왔으며, 이러한 추출방법에서 용매의 종류, 추출 시간, 추출 온도 등의 조건들은 천연물(예, 해조류)로부터 추출되는 성분과 그 생리활성에 직접적인 영향을 미친다. 예를 들어 추출 용매에 따라 생리활성의 차이를 보고한 선행연구에서 갈조류(다시마, 툇, 미역, 모자반) 물 추출물은 에탄올 추출물에 비해 지방생성 저해 효과가 유의적으로 탁월하였다(Oh & Lee 2015). 또한 해조류 5종(미역, 다시마, 김, 파래, 툇)의 물 추출물도 에탄올과 메탄올 추출물과 비교하여 추출 수율, 환원당 함량, 총 폴리페놀 함량을 높을 뿐만 아니라, 항산화, 미백효과(tyrosinase 저해효과)도 뛰어난 것을 확인하였다(Na et al. 2014).

염증은 신체의 자연적인 방어 기전으로 체내의 면역세포가 외부의 자극이나 세균 감염을 인지하고 다양한 염증 매개체를 분비하여 손상된 조직을 치유하고 재생시키는 과정이다. 지나친 면역 활성화는 만성 염증을 유도할 수 있으며, 다

*Corresponding author: Yunkyoung Lee, Department of Food Science and Nutrition, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju 63243, Republic of Korea
Tel: +82-64-725-2539 Fax: +82-64-725-2539 E-mail: lyk1230@jejunu.ac.kr

양한 만성 염증 관련 질환은 중요한 사망 위험 요인으로 작용한다. 세계적으로 5명 중 3명이 뇌졸중, 만성 호흡기 질환, 심장병, 암, 당뇨병과 같은 만성 염증과 관련된 질환들로 인해 사망한다고 보고 되고 있다(Pahwaet et al. 2021). 항염증 약물로 다양한 비스테로이드항염증제가 개발·처방되어 왔지만 장기간의 복용은 위, 장의 궤양, 부종, 신장질환, 골다공증, 감염 등의 부작용을 일으킬 수 있다(Kim 2004). 그러므로 이러한 만성 염증의 예방·치료에 도움을 주고, 동시에 부작용을 최소화시킬 수 있는 천연물 유래 염증 조절 물질들에 대한 연구가 활발히 진행되어 오고 있다.

염증 상태를 세포실험에서 재현하기위해서 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)를 이용하는데, LPS는 지질과 다당류로 구성된 거대 분자로, 그람 음성 박테리아 외막의 주성분이다. 대식세포는 이러한 LPS의 자극에 의해 염증 신호전이 활성화되어 nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 다양한 염증관련 인자 및 사이토카인의 생산이 증가한다. 대부분의 항염증 연구들은 내독소로 염증 상태를 유도하여 항염증 효과를 측정하는데 초점을 맞춰 염증이 없는 정상상태에서 타겟 물질의 염증활성의 관찰연구는 상대적으로 미비하다. 이에 본 연구에서는 다시마 물 추출물(Laminaria japonica extract, LJE)의 항산화 효과를 포함한 이화학적 특성을 살펴보고, mouse 대식세포주를 이용하여 LJE의 세포독성과 정상수준과 LPS로 염증을 유도한 상태에서 LJE의 면역활성 효과 및 항염증 효과를 확인해 보고자 하였다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 시료의 추출

본 실험에 사용된 다시마는 한국 제주도 전통시장에서 구입하여 세척, 탈염 및 동결 건조 과정 처리하여 분쇄시켰다. 동결 건조된 다시마 분말에 3차 증류수(30 g에 1 L)를 첨가하여 상온에서 24시간 교반 시킨 후, 진공 여과의 과정을 거쳐 62°C에서 여과액 양의 반까지 농축시켰다. 최종적으로 LJE의 농축된 용액을 얻었으며, 이를 동결건조시켜 획득한 파우더를 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco, Gaithersburg, MD, USA)에 용해, 필터로 여과하여 -20°C에 보관하면서 세포실험에 사용하였다.

2. 총 폴리페놀 함량

LJE의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 이용해서 측정하였다(Folin & Denis 1912). LJE (8 mg/mL) 50 μ L와 동량의 1 M Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FMD Millipore Corporation, Burlington, MA, USA)를 96-well plate에 첨가해서 실온에서 6분을 반응시키고, 2% Na₂CO₃ solution 100 μ L를 첨가해서 암실에서 추가로 30분 더 반응시켰다. Gallic acid (Sigma, MO, USA)를 사용하여 표준곡선을 도

출하였으며, microplate reader (Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid concentration equivalents (GAE)를 기준으로 산출하였다.

3. 다시마 물 추출물의 항산화능 측정

1) ABTS 라디칼 소거능

LJE의 항산화능은 ABTS 라디칼 소거능 분석법을 이용하여 측정하였다(Re et al. 1999). ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 7.4 mM로 준비하여 동량의 2.6 mM potassium persulfate (1:1)와 혼합하여 암실에서 12-24시간 동안 반응시켜, ABTS stock solution으로 사용하였다. ABTS stock solution는 735 nm에서 흡광도가 1.40-1.50이 되도록 증류수로 희석하여 실험에 사용하였다. 농도별로 준비한 25 μ L의 LJE (0.08, 0.4, 0.8, 1.6, 8 mg/mL)는 ABTS working solution 175 μ L와 혼합하여 실온에서 30분 동안 반응시켜, 735 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid를 positive control로 사용하여, 다음 식과 같이 LJE의 ABTS 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ = [1 - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{sample blank}}/\text{OD}_{\text{control}})] \times 100$$

OD: optical density

2) DPPH 라디칼 소거능

LJE의 항산화능은 DPPH 라디칼 소거능 분석법을 이용하여 측정하였다. 농도별로 준비한 25 μ L의 LJE (0.08, 0.4, 0.8, 1.6, 8 mg/mL)는 0.2 mM DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)나 DMSO (background) 175 μ L를 96-well plate에 첨가하고 실온에서 30분 반응시켰다. 515 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid를 positive control로 사용하여, 다음 식과 같이 LJE의 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ = [1 - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{sample blank}}/\text{OD}_{\text{control}})] \times 100$$

OD: optical density

4. 대식세포주 배양 및 LJE의 세포 독성 측정

대식세포, RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA.)에서 구매하여 실험에 사용하였다(Cui 2021). 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (P/S) 포함된 high-glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM-high glucose) 배지를 사용하고 37°C, 5% CO₂에서 배양했다. 본 실험에서 사용된 RAW 264.7 세포는 모두 passages 30 이

<Table 1> Primer sequences for RT-qPCR

Target genes	Primer sequences (5'-3')	
	Forward	Reverse
<i>Rplp0</i> (<i>36b4</i>)	GGATCTGCTGCATCTGCTTG	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT
<i>Tnf-α</i>	GGCTGCCCCGACTACGT	ACTTCTCCTGGTATGAGATAGCAAAT
<i>IL-6</i>	CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT	AGGGAAGGCCGTGGTTGT
<i>IL-1β</i>	AAATACCTGTGGCCTTGGGC	CTTGGGATCCACACTCTCCAG

하였으며, 모든 세포 배양 시약은 Gibco (BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 구매하였다. 세포생존율의 측정은 tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, or MTT) assay를 이용하였다. 우선 RAW 264.7 세포는 0.25×10^6 cells/well의 농도로 24-well plates에서 1% FBS, 1% P/S 포함된 DMEM-high glucose에서 배양하여, 다양한 농도의 LJE (1, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24시간 처치하였다. MTT solution 5 mg/mL를 well에 분주하여 3-4시간 추가 배양한 후 상층액을 제거하고 DMSO를 첨가해서 생성된 formazan이 충분히 용출될 수 있도록 교반시켰다. 최종 반응액 50 μL 를 96-well plate로 옮겨 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음 식을 이용해서 계산하였다.

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

5. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO 생성량 측정은 Griess 반응법을 이용하여 측정하였다 (Yang et al. 2019). Six-well plate에서 16-18시간 배양한 RAW 264.7 세포(1×10^6 cells/well)에 LJE 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 6시간 처치 후에 LPS(100 ng/mL)를 첨가해서 총 24시간을 배양하였다. 시료의 상층액 50 μL 와 동량의 Griess reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 96-well plate에 분주하여 실온에서 10-15분 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 540 nm를 흡광도를 측정하였다. Nitrite 생성량은 sodium nitrite (NaNO_2)를 이용해서 만든 표준 곡선 값을 이용하여 계산하였으며, LPS 처치군의 NO 값을 양성대조군으로 사용하였다.

6. Total RNA 추출 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR)을 이용한 mRNA 발현 분석

RAW 264.7 세포의 total RNA 추출은 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. 배양액을 제거 한 세포를 PBS로 2-3회 세척한 후 TRIzol reagent를 처리하여 균질화하고 chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 15분) 하였다. 원심분리 후 획득한 RNA를 포함하는 상층액과 동량의 isopropyl alcohol을 첨가하여 total RNA를 침전 분리하였다. Total RNA 정량은 NanoDrop spectrometer (Nano200

MicroSpectrophotometer, Hangzhou, China)를 이용하였으며, 260/280 nm 파장에서 측정된 흡광도의 비율이 1.8-2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA를 mRNA 발현 분석에 사용하였다. cDNA 합성은 total RNA 2 μg 를 high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하였고, 제조된 cDNA로 염증성 사이토카인 유전자의 발현을 측정하기 위해 SYBR Green Master mix를 이용하여 real time RT-PCR을 수행하였다. 이때 PCR 조건은 50°C/2분, 95°C/2분, 95°C/15초, 60°C/1분으로 40회 반복하여 증폭하였으며, CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, USA)을 이용하였다. 측정하고자 하는 목적 유전자의 발현은 표준대조군(internal housekeeping gene)인 *Rplp0* (*36b4*)의 발현량을 이용하여 정량화 하였으며, 분석에 사용한 각각의 primer(Macrogen, Seoul, Korea) 염기서열은 <Table 1>과 같다.

7. 염증관련 사이토카인 생성량 측정

염증성 사이토카인 생성량은 ELISA assay를 사용하였다 (Cui et al. 2022). Six-well plate에서 16-18시간 배양한 RAW 264.7 세포에 LJE 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 6시간 처치한 후 LPS를 첨가해서 총 24시간을 배양하였다. 시료의 상층액(TNF- α : 500배; IL-6: 50배 희석)은 ELISA kit (TNF- α , IL-6: BD PharMingen, San Jose, CA, USA)를 이용하여 판매처의 protocol에 따라 실험을 진행한 후에 450 nm 및 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. ELISA kit에 포함되어 있는 TNF- α 와 IL-6 단백질을 이용하여 얻은 표준곡선을 통해 시료의 치료로 대식세포의 TNF- α 및 IL-6 생성량을 산출하였다.

8. 통계 처리

모든 데이터는 GraphPad Software, Prism 8.0.1 (San Diego, CA, USA)을 이용하였다. 기술통계분석을 실시하여 평균과 표준편차/표준오차를 구했으며, 실험 처치군에 따라 analysis of variance (ANOVA) one-way multiple comparison (Dunnett's 혹은 Tukey's multiple comparisons) 또는 t-test ($p < 0.05$)를 실시하였다. 모든 값은 평균 \pm 표준편차/오차로 나타냈다.

III. 결과 및 고찰

1. 다시마 물 추출물(LJE)의 총 폴리페놀 함량

LJE의 총 폴리페놀 수치는 2.16±0.11 µg GAE/mg로, 이는 선행연구 Kang et al. (2018)의 연구 결과에서 보고된 다시마 물 추출물의 폴리페놀 함량 2.08±0.01 µg GAE/mg 및 Hwang et al. (2017)의 연구 결과에서 보고한 다시마 물 추출물의 총 폴리페놀 함량 2.57±0.37 µg GAE/mg과 유사한 수치를 나타냈다(Kang et al. 2018; Hwang et al. 2017). 그 이외에, Kim et al. (2011)의 연구에서 LJE 총 폴리페놀 수치는 0.35 µg GAE/mg으로 나타났다(Kim et al. 2011). Na et al. (2014)의 연구에서 LJE 총 폴리페놀 수치는 4.3±0.8 µg tannic acid/mg으로 나타났다(Na et al. 2014). 열풍 건조로 인해 다시마의 폴리페놀 성분의 파괴가 발생할 수 있으므로 본 연구에서 다시마는 동결건조 방법을 사용하였다(Baek et al. 2019). 본 실험실에서 최적화된 물추출법이 지속적으로 유사한 결과물을 만들어 낸다는 점과 2017년, 2018년 및 2019년 3년간 사용한 국내산 다시마 물추출물의 폴리페놀 성분은 유의적인 차이가 없다는 것을 확인하였다.

반면 Lee(2013)의 연구에서는 다양한 해조류(김, 미역, 다시마, 툇)의 에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량을 비교하였는데, 그 중 다시마 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 10.09 µg GAE/mg으로 나타났다(Lee 2013). Kwak et al. (2005)의 연구에서는 해조류(미역, 다시마, 툇, 파래, 김)의 에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량을 비교한 결과중에서 다시마 에탄올 추출물은 1.17 µg tannic acid/mg으로 나타났다(Kwak et al. 2005). 이와 같이 추출 용매 및 다른 실험실의 추출 최적화 프로토콜의 차이에 따라 다시마 추출물의 총 폴리페놀 함량이 다를 수 있다.

특히 추출방법 중 온도의 변화 또한 추출물이 함유하는 총 폴리페놀 함량에 영향을 미쳤다(Park et al. 2012). 예를 들

<Table 2> Total polyphenol contents of LJE

Samples	Total polyphenol contents (µg GAE/mg)
LJE	2.16±0.11

The concentration of samples was 2 mg/mL.

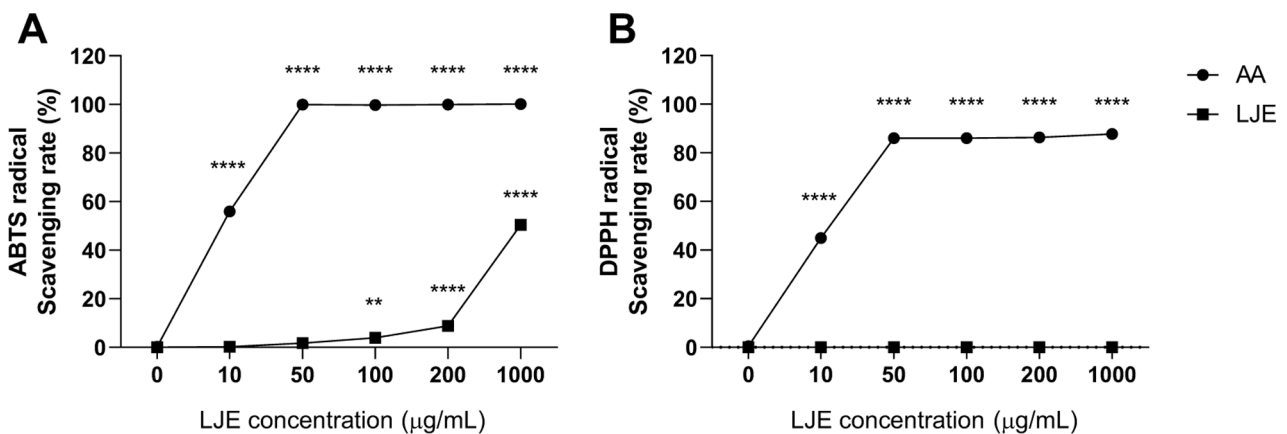
The data are presented as the mean±SD. Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract. GAE, gallic acid concentration equivalents.

어 Kim et al. (2015)에 의하면 해조류 열수 추출물(9종: 곰피, 대황, 매생이, 모자반, 미역, 지충이, 청각, 툇, 파래)의 폴리페놀 함량이 에탄올 추출물 보다 더 낮게 나타났다(Kim et al. 2015). Na et al. (2014)에 의하면 아미계 추출물이 열수 추출물, 용매(에탄올, 메탄올) 추출물 보다 더 높게 나타났다(Na et al. 2014). 이와 같이 해조류의 추출방법(예, 추출 용매, 온도 등)은 추출물의 폴리페놀 함량에 직접적인 영향을 주는 것을 확인하였다.

2. LJE의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성

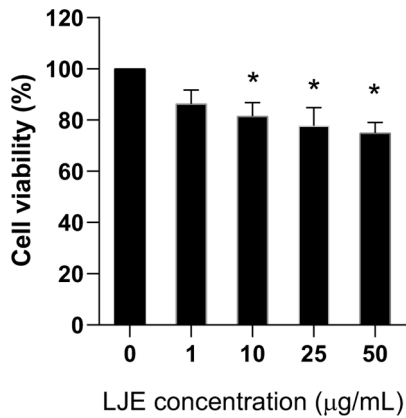
LJE의 항산화 효과 측정은 2가지 라디칼 소거 활성 실험을 실시하였다. ABTS 라디칼 소거능 결과는 <Figure 1A>와 같다. LJE의 ABTS 라디칼 소거능은 양성 대조군(Ascorbic acid, AA)보다는 낮았으나, 농도별로 ABTS 라디칼 소거능이 증가하는 결과를 보였다. LJE 1,000 µg/mL의 농도에서 ABTS 라디칼 소거능 결과는 50.5%로 나타났다.

LJE의 DPPH 라디칼 소거능 결과는 <Figure 1(B)>와 같다. ABTS 결과와는 달리 LJE의 DPPH 라디칼 소거능은 가장 높은 농도인 1,000 µg/mL LJE에서도 라디칼 소거능을 보이지 않았다. Kim et al. (2011)의 연구에서도 본 연구와 유사한 결과를 보였는데, 다시마 물 추출물 1,000 µg/mL 농도까지는 DPPH 라디칼 소거능이 나타나지 않았으나 2,500 µg/mL 다시마 물추출물의 농도부터 DPPH 라디칼 소거능



<Figure 1> ABTS and DPPH radical scavenging activity of LJE.

(A) ABTS radical scavenging activity of LJE, (B) DPPH radical scavenging activity of LJE. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 compared with control group (0 µg/mL concentration). Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; AA, Ascorbic acid.



<Figure 2> Cellular toxicity of LJE in RAW 264.7 cells. Cytotoxicity of LJE on RAW 264.7 cells determined via an MTT assay. The data are presented as the mean±SEM of three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. Asterisks (*) indicate significant differences of $p < 0.05$. Abbreviations: MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; LJE, *Laminaria japonica* extract.

5% (50,000 µg/mL에서 86.4%)로 나타났다(Kim et al. 2011). 즉 고농도의 다시마 물 추출물에서 DPPH 라디칼 소거능의 활성이 공통적으로 관찰되었다. 단 본 연구에서는 세포실험에 적용을 고려하여 1,000 µg/mL LJE 농도 이상으로 진행하지 않았음은 언급해 둔다. 항산화 활성의 기작은 항산화 물질이 인체내에서 노화와 세포손상을 일으키는 자유 라디칼을 소거함으로써 산화를 방지하는 것이며, LJE는 ABTS 라디칼 소거능을 통한 항산화능을 가짐을 확인하였다. 또한, LJE의 ABTS와 DPPH 라디칼 소거능의 결과가 상이하게 나타난 것은 ABTS는 cation 라디칼과 반응하지만 DPPH는 자유라디칼과 반응하는 기질의 특성 때문으로 사료된다. 이와 유사한 결과는 선행연구들에서도 찾아볼 수 있으며, 예를 들

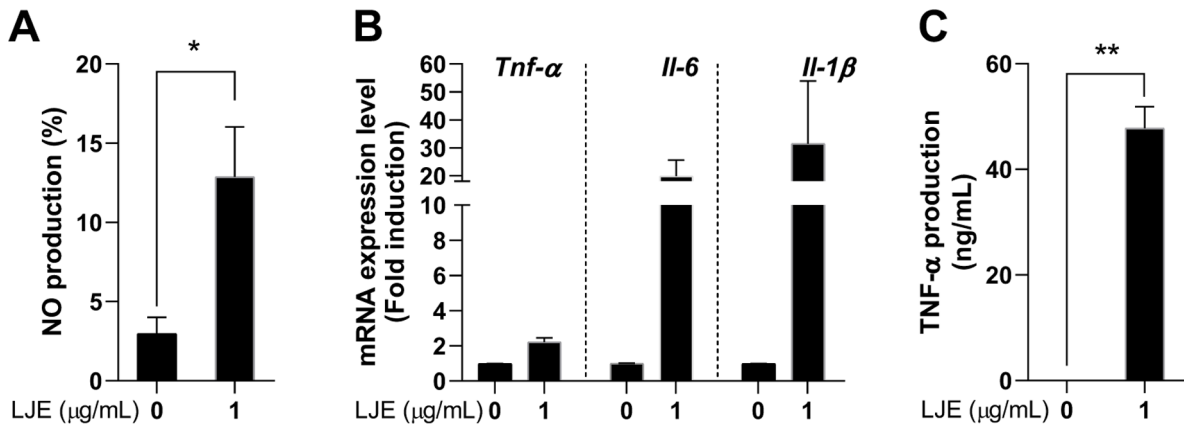
어 Lee et al. (2021)과 Jung et al. (2019) 연구에서도 타겟 물질의 항산화 측정 방법에 따라 상이한 항산화 효과를 관찰하였다(Jung et al. 2019; Lee et al. 2021).

3. LJE 처치가 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향

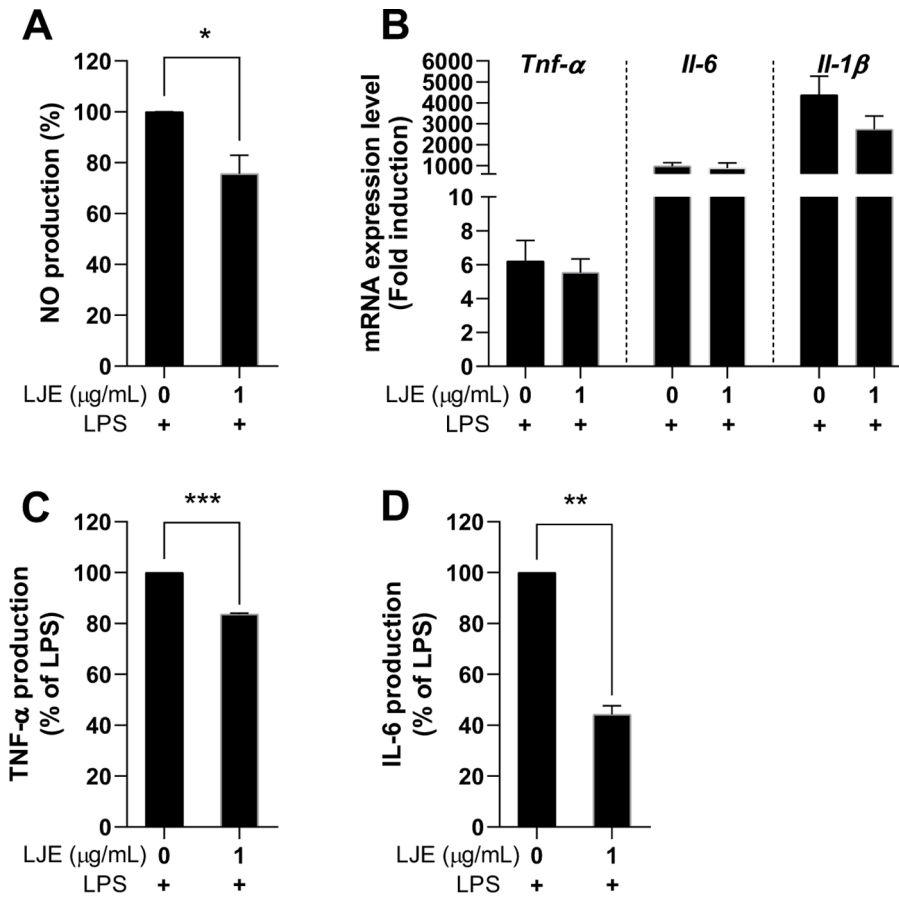
LJE가 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 해조류 추출물을 1, 10, 25, 50 µg/mL의 농도로 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 통해서 세포 독성을 확인하였다<Figure 2>. 그 결과, 대조군에 비하여 LJE는 10 µg/mL 부터 세포 생존율의 유의적인 감소를 나타냈다. 따라서 MTT assay 결과에 따라 추후 실험에서는 세포 독성이 나타나지 않는 1 µg/mL LJE를 처리농도로 결정하여 진행하였다.

4. RAW 264.7 세포에서 LJE의 처치가 면역활성에 미치는 효과와 기전

염증은 사이토카인의 활성화로 산화질소 합성효소(iNOS)에 의해 다량의 산화질소(NO) 형성을 유도한다(Soufli et al. 2016). LJE의 면역활성 효과를 평가하기 위해서 RAW 264.7 세포에서 LJE의 NO 생성량, 다양한 염증관련 사이토카인 (*Tnf-α*, *Il-6* 및 *Il-1β*)의 mRNA 및 단백질 발현을 확인하였다. RAW 264.7 세포에 LJE를 24시간 처리하였을 때 대조군에 비해 NO 생성량<Figure 3A>, *Tnf-α* 및 *Il-6* mRNA 생성량을 유의적으로 증가시켰으나, *Il-1β*의 mRNA 발현량에는 유의적인 차이를 보이지 않았다<Figure 3B>. 또한, 단백질 발현 수준에서도 LJE의 처리는 대조군에 비해 염증성 사이토카인 TNF-α 생성량을 유의적으로 증가시켰으나, IL-6의 생성량에는 유의적인 변화를 보이지 않았다<Figure 3C>. Fang et al. (2015)의 연구에서도 본 연구와 유사한 결과를 제시하였는데, 다시마 유래 다당류가 RAW 264.7 세포에서



<Figure 3> Immunomodulatory effect of LJE on RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with LJE (1 µg/mL) for 24 hrs. (A) Effect of LJE on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. (B) Effect of LJE on *Tnf-α*, *Il-6* and *Il-1β* mRNA expression in RAW 264.7 cells. (C) Effect of LJE on proinflammatory cytokines TNF-α production in RAW 264.7 cells. The data are presented as the mean±SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed using *t*-test. Asterisks (*) indicate significant differences from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract, NO: nitric oxide, TNF-α: tumor necrosis factor-α, IL-6: interleukin-6, IL-1β: interleukin-1β.



<Figure 4> Anti-inflammatory effect of LJE on LPS-induced RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with LJE (1 μg/mL) for 6 hrs, then incubated with LPS (100 ng/mL) for another 18 hrs. (A) Effect of LJE on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. (B) Effect of LJE on *Tnf-α*, *Il-6* and *Il-1β* mRNA expression in RAW 264.7 cells. (C, D) Effect of LJE on proinflammatory cytokines TNF-α and IL-6 production in RAW 264.7 cells. The data are presented as the mean±SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed using *t*-test. Asterisks (*) indicate significant differences from LPS treated group (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001). Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract, NO: nitric oxide, TNF-α: tumor necrosis factor-α, IL-6: interleukin-6, IL-1β: interleukin-1β.

NO 생성량, 염증성 사이토카인 *Tnf-α*, *Il-6*, *Il-1β* 생성량 및 mRNA 발현을 유의적으로 증가하여 다시마 유래 다당류의 면역활성효과를 보고하였다(Fang et al. 2015). 즉, RAW 264.7 세포에 LJE를 단독 처치는 LJE의 면역활성효과의 보여 주었다.

5. LPS로 염증유도한 RAW 264.7 세포에서 LJE의 항염증 효과와 기전

LJE의 항염증 능력 효과를 확인하기 위해서 LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 세포에서 LJE의 NO 생성량, 다양한 염증관련 사이토카인(*Tnf-α*, *Il-6* 및 *Il-1β*)의 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다. LJE는 LPS로 유도된 NO 생성량을 유의적으로 감소시켜 항염증 효과를 보여 주었다 <Figure 4A>. Choi et al. (2008)의 연구에서는 다시마 메탄올 추출물이 LPS로 유도한 NO 생성량을 20-30% 감소시켜 본 연구 결과와 비슷하게 나타났다(Choi et al. 2008). LPS로 염증유도한 RAW 264.7 세포에 LJE의 처치는 대조군과

비교하여 염증성 사이토카인 *Tnf-α*, *Il-6* 및 *Il-1β* mRNA의 생성량의 유의적인 차이가 없었으나<Figure 4B>, LJE는 LPS에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 단백질 TNF-α 및 IL-6의 분비를 유의적으로 억제하였음을 확인하였다<Figure 4C>. 즉, LJE의 RAW 264.7 세포에서의 사이토카인 분비의 조절을 통한 항염증 효과는 전사(transcription) 차원에서의 조절보다는 번역(translation)차원에서의 조절이 더 큰 영향을 미치는 것으로 보인다. Park et al. (2013)의 연구에서도 다시마 물 추출물은 LPS에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 TNF-α 및 IL-6의 생성량을 감소한 결과를 보여 본 연구와 유사하였다(Park et al. 2013). 또한 다른 선행연구에 의하면 다시마 물 추출물 뿐만 아니라 발효 다시마가 염증신호전달 관련 단백질인 extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 c-JUN NH2-terminal protein kinase (JNK)의 인산화를 통한 잠재적 항염증 효과를 기전을 제시하였고, 다시마 유래 다당류의 처치가 nuclear factor kappa-B (NF-κB) 및 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호통로의 억제를 통한

항염증 기전을 보고한 바 있다(Hwang et al. 2017; Peng et al. 2015).

본 연구 결과에서 보여준 대식세포의 정상상태와 염증상태에서 LJE의 상이한 면역조절 효과(이상성반응, biphasic response)는 Liu et al. (2017) 연구에서도 보고된 바 있다. 즉, 미생물 유래 다당류, xanthan gum은 RAW 264.7 세포에서 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성량을 농도 의존적으로 증가시키는 반면에 LPS로 염증 유도 상태에서의 xanthan gum 처리는 증가한 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성량을 농도 의존적으로 감소시켰다(Liu et al. 2017). 이와 같이 다시마 물 추출물과 미생물 유래 다당류는 정상상태에서는 염증성 사이토카인 분비를 촉진하는 반면 염증상태에서는 생산량이 증가한 사이토카인의 수치를 감소시키는 면역활성과 항염증 효과, 즉 biphasic 염증조절 효과를 가진다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 LJE의 총 폴리페놀 함량은 2.16 \pm 0.11 μ g GAE/mg로 나타났다. ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성을 이용하여 LJE의 항산화 효과를 분석한 결과, 농도별로 ABTS 라디칼 소거능이 증가하는 결과가 나타났으며 LJE 1,000 μ g/mL의 농도에서 50.5%의 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. 반면 LJE의 DPPH 라디칼 소거능은 관찰되지 않았다. 농도별 LJE (1-50 μ g/mL)를 RAW 264.7 세포에 처리하여 세포독성을 확인한 결과, LJE 1 μ g/mL 농도에서 세포독성을 나타내지 않아, 이를 처리 농도로 결정하여 실험을 진행하였다. RAW 264.7 세포에서 LJE의 처리는 NO 생성량을 대조군에 비해 유의적으로 증가시켰으나, 염증유도한 RAW 264.7 세포에서 LJE의 처리는 LPS로 증가한 NO 생성량을 유의적으로 감소시켰다. 또한 LJE의 처리는 정상상태의 RAW 264.7 세포에서 *Tnf- α* , *Il-6* mRNA 발현량 및 TNF- α 생성량을 대조군에 비해 유의적으로 증가시켰다. 반면에, LPS로 염증유도한 RAW 264.7 세포에서 LJE의 처리는 증가한 TNF- α 및 IL-6 생성량을 유의적으로 감소시켰다. 이와 같이 본 연구에서는 LJE는 항산화 효과를 가지며, mouse 대식세포모델에서 정상상태에서는 면역활성 효과를 염증상태에서는 항염증 효과를 가짐을 확인하였다.

저자정보

최가미(제주대학교, 박사과정 대학원생, 0000-0002-9126-9667)

김은영(제주대학교, 박사과정 대학원생, 0000-0001-9018-1797)

Guiguo Zhang (산동농업대학교, 동물영양학과, 교수, 0000-0002-0515-2172)

이윤경(제주대학교, 식품영양학과, 부교수, 0000-0001-6453-769X)

감사의 글

본 연구는 the National Key R&D Program of China-Korea Cooperative Project 2019YFE0107700와 한국연구재단 NRF-2019K1A3A1A20081146의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Baek SH, Lee HJ, Lee CH, Nam TJ, Lee SG 2019. Change of fucoxanthin and total antioxidant capacities of *Saccharina japonica* during the drying process. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 51:524-530
- Cho JY, Bang MA. 2004. Hypoglycemic and antioxidative effects of dietary sea-tangle extracts supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.*, 37:5-14
- Choi JS, Shin SH, Ha YM, Kim YC, Kim TB, Park SM, Choi IS, Song HJ, Choi YJ. 2008. Mineral Contents and Physiological Activities of Dried Sea Tangle (*Laminaria japonica*) Collected from Gijang and Wando in Korea. *J. Life Sci.*, 18:474-481
- Cui J. 2021. Comparison of biological characteristics and immunomodulatory effect between purified polysaccharides and water extract from *Laminaria japonica*, Master's degree thesis, Jeju National University, Korea, pp 26-27
- Cui J, Wang Y, Kim E, Zhang C, Zhang G, Lee Y. 2022. Structural characteristics and immunomodulatory effects of a long-chain polysaccharide from *Laminaria Japonica*. *Front. Nutr.*, 762595:1-16
- Fang Q, Wang JF, Zha XQ, Cui SH, Cao L, Luo JP. 2015. Immunomodulatory activity on macrophage of a purified polysaccharide extracted from *Laminaria japonica*. *Carbohydr. Polym.*, 134:66-73
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, 12:239-243
- Hwang YJ, Chae I, Lee Y. 2017. Anti-inflammatory effects of fermented *Laminaria japonica* and *Hizikia fusiforme* water extracts with probiotics in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cell line. *J. East Asian Soc. Diet. Life*, 27:1-8
- Jung KI, Kim BK, Kang JH, Oh GH, Kim IK, Kim M. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water and the fermentation liquid of sea tangle (*Saccharina japonica*). *J. Life Sci.*, 29:596-606
- Kang SY, Kim E, Kang I, Lee M, Lee Y. 2018. Anti-diabetic effects and anti-inflammatory effects of *Laminaria*

- japonica and Hizikia fusiforme in skeletal muscle: in vitro and in vivo model. *Nutr.*, 10:1-12
- Kim JH, Kang HM, Lee SH, Lee JY, Park LY. 2015. Antioxidant and α -glucosidase inhibition activity of seaweed extracts. *Korean J. Food Preserv.*, 22:290-296
- Kim JH, Lee DS, Lim CW, Park HY, Park JH. 2002. Antibacterial activity of sea-mustard, *Laminaria japonica* extracts on the cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, 35:191-195
- Kim KS. 2004. Clinical Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Korean J. Otorhinolaryngol.-Head Neck Surg.*, 47:91-98
- Kim YS, Kang CO, Kim MH, Cha WS, Shin HJ. 2011. Contents of water extract for *Laminaria japonica* and its antioxidant activity. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, 26:112-118
- Kwak CS, Kim S, Lee MS. 2005. The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34:1143-1150
- Lee HS, Song MW, Kim KT, Hong WS, Paik HD. 2021. Antioxidant effect and sensory evaluation of yogurt supplemented with hydroponic ginseng root extract. *Foods*, 639:1-10
- Lee NY. 2013. Antioxidant effect and tyrosinase inhibition activity of seaweeds ethanol extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 42:1893-1898
- Li HY, Yi YL, Guo S, Zhang F, Yan H, Zhan ZL, Zhu Y, Duan JA. 2022. Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Laminaria japonica*: A review. *Food Chem.*, 370:1-10
- Lin H-TV, Lu WJ, Tsai GJ, Chou CT, Hsiao HI, Hwang PA. 2016. Enhanced anti-inflammatory activity of brown seaweed *Laminaria japonica* by fermentation using *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.*, 51:1945-1953
- Liu F, Zhang X, Ling P, Liao J, Zhao M, Mei L, Shao H, Jiang P, Song Z, Chen Q. 2017. Immunomodulatory effects of xanthan gum in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Carbohydr. Polym.*, 169:65-74
- Na HS, Kim JY, Park JS, Choi GC, Yang SI, Lee JH, Cho JY, Ma SJ. 2014. Characteristics of marine algae extracts using subcritical water extract method. *Korean J. Food Preserv.*, 21:62-68
- Oh JH, 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. Diet. Life*, 25:990-998
- Park JN, Ali-Nehari A, Woo HC, Chun BS. 2012. Thermal stabilities of polyphenols and fatty acids in *Laminaria japonica* hydrolysates produced using subcritical water. *Korean J. Chem. Eng.*, 29:1604-1609
- Park SK, Park SJ, Park SM, Cho IJ, Park CI, Kim YW, Kim SC. 2013. Inhibition of acute phase inflammation by *Laminaria japonica* through regulation of iNOS-NF- κ B pathway. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 439498:1-11
- Peng FH, Zha XQ, Cui SH, Asghar MN, Pan LH, Wang JH, Luo JP. 2015. Purification, structure features and anti-atherosclerosis activity of a *Laminaria japonica* polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.*, 81:926-935
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26:1231-1237
- Soufli I, Toumi R, Rafa H, Touil-Boukoffa C. 2016. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, 7:353-360
- Yang HS, Haj FG, Lee M, Kang I, Zhang G, Lee Y. 2019. *Laminaria japonica* extract enhances intestinal barrier function by altering inflammatory response and tight junction-related protein in lipopolysaccharide-stimulated Caco-2 cells. *Nutr.*, 11:1-14
- Yoo H, Lee D. 2004. Chungkookjang fermentation of mixture of barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Korean J. Microbiol.*, 40:49-53
- Zhu Q, Chen J, Li Q, Wang T, Li H. 2016. Antitumor activity of polysaccharide from *Laminaria japonica* on mice bearing H22 liver cancer. *Int. J. Biol. Macromole*, 92:156-158
- Pahwa R, Goyal A, Jialal I. Chronic inflammation. 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>, [accessed 2022. 08. 22]

Received August 23, 2022; revised August 31, 2022; accepted August 31, 2022