



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](#)

碩士學位論文

다시마 물 추출물과 다시마
유래 다당류의 이화학적 특성
및 항염증 효과

濟州大學校 大學院

食品營養學科

崔 佳 美

2021年 2月



다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 이화학적 특성 및 항염증 효과


指導教授 李 允 京


崔 佳 美


이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2020年 12月

崔 佳 美의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 김 인 혜 

委 員 이 윤 경 

委 員 채 인 숙 

濟州大學校 大學院

2020年 12月

감사의 글

어느덧 한국에 들어온 지도 거의 8년이 되었습니다. 2014년 3월, 저는 제주대학교 식품영양학과 학부로 입학하여 4년의 학업을 마치고, 2018년 03월에 식품영양학과 일반 대학원에 입학했습니다. 공부, 실험을 하면서 석사 학위논문을 진행하였습니다. 실험이 잘 진행되지 않았고 실패하는 경우도 많았으며 결과가 예상했던 것과 반대되는 경우도 많았습니다. 하지만, 저에게는 저를 항상 지지해주시고 도움을 주시는 많은 주변분들이 계셨고, 그 분들 덕분에 어려웠지만, 행복했던 석사생활을 마무리할 수 있었습니다. 그 분들께 다음과 같이 감사의 마음을 전합니다.

먼저 제일 감사드리고 싶은 분은 제가 제일 존경하는 이윤경 교수님입니다. 이윤경 교수님은 저의 지도 교수님이시, 저는 이 분이 세상에서 가장 좋은 교수님이 라고 생각합니다. 항상 학생들을 먼저 생각해주시고 학생들을 위해 많은 일들을 해주십니다. 학술적 지식 또한 높으시고 항상 실험을 흥미로운 방향으로 지도 해주십니다. 한국어 실력이 부족한 저의 논문을 글자 하나하나까지 세심하게 검토하고 조언해주셨고, 본인의 쉬는 시간을 이용하여 저의 발표, 실험, 논문 등 많은 부분을 신경을 써주셨습니다. 교수님 덕분에 석사과정을 하는 동안 공부, 연구를 더 열심히 하게 되었던 동력이 되었고, 저의 앞으로의 인생 목표를 찾았습니다. 저는 저의 지도 교수님의 제자로서 진심으로 너무 자랑스럽고 너무 행운이라고 생각합니다. 그리고 우리 실험실 박사 과정 선생님이자 좋은 멘토, 가장 친한 언니인 김은영 언니에게도 감사드립니다. 은영언니는 저에게 실험을 하나하나 가르쳐 주셨고, 제가 실험을 실패할 때에는 항상 같이 옆에서 응원해주시고 왜 이렇게 되는 지 같이 분석하고 여러 방법에 대해 고민하여 실패를 극복할 수 있도록 도움을 주신 것, 저에겐 이 모든 것이 엄청 큰 힘이 되었습니다. 실험, 그리고 생활적인 여러 부분에서 또한 부족한 저를 항상 도와주셨습니다. 언니 덕분에 실험뿐만 아니라 서툴렀던 타지에서의 생활에서도 더 의미있고 재미있게 지낼 수 있었습니다. 저의 석사생활이 마무리될 무렵 우리 실험실에 들러오게된 학부생 강민혁에게도 고마운 마음을 전합니다. 힘이 필요할 때마다 도와주시고 제가

실험 때문에 기분이 안 좋을 때 마다 재미있게 위로해 줬습니다. 매일 옆에서 논문을 빨리 쓰라고 해준 덕분에 논문 좀 더 빨리 완성했습니다.

식품영양학과 고양숙 교수님, 박성수 교수님, 채인숙 교수님, 강인혜 교수님, 신동범 교수님께도 감사드립니다. 교수님들 덕분에 식품영양 관련 지식들을 많이 알게 되었고 이 분야에 대해 더 흥미를 느낄 수 있었습니다. 그리고 중국 산둥대학교 Guiguo Zhang 교수님께 감사드립니다. 다당류 추출 방법 등 많은 지식과 실험들을 배울 수 있었습니다. 궁금한 부분을 질문했을 때 언제나 자세히 가르쳐 주셨습니다.

그리고 중국에 계신 부모님께 너무 감사드립니다. 항상 저를 이해해 주시고 응원해주셔서 긴 학업기간 동안 큰 힘이 되었습니다. 힘들 때마다 위로 해주시고 저의 학업, 실험 모든 것을 다 지지해주시고 응원해 주셔서 편한 마음으로 학업에만 집중할 수 있었습니다. 또한, 저의 큰아버지 Wenbin Cui께도 감사드립니다. 큰아버지 덕분에 한국으로 유학을 올 수 있었고 공부에 흥미를 가지기 시작하였습니다. 부모님과 큰아버지뿐만 아니라 모든 가족분들의 무조건적인 응원이 저의 석사생활에 아주 큰 힘이 되었습니다. 감사드립니다.

한국에서 아버지처럼 저에게 관심을 가져주시고 잘 챙겨주신 강병근 과장님께 감사드립니다. 또한 고지영 선생님께도 감사드립니다. 선생님 덕분에 한국어 실력이 더 빨리 향상 될 수 있었고, 향상된 한국어 실력으로 전공 공부를 더 잘 할 수 있었습니다. 항상 저를 챙겨주시고 응원해주신 박미선 선생님께도 감사드립니다. 과장님, 선생님들께서 항상 가족처럼 잘 챙겨주시고 어려운 문제들이 생겼을 때에는 좋은 방법들로 해결해 주신덕분에 더 따뜻하고 행복한 한국생활을 하고 있습니다. 항상 응원해 주셔서 감사드립니다.

중국에 있는 친구들과 한국에서 만난 친구들, 유학생생활을 같이했던 친구들에게도 감사드립니다. 이 친구들에게 힘들 때 많은 위로를 받았고, 친구들이 있었기에 행복했습니다.

마지막으로 제가 실험에서 사용했던 RAW 264.7 세포들 잘 자라줘서 고맙습니다.

서투른 논문이지만 여러분의 응원과 사랑 덕분에 드디어 완성하였습니다. 앞으로도 더 열심히 하겠습니다. 도와주신 분들께 감사드립니다.

최가미
제주대학교
2021.02

목 차

Abstract	iii
List of Abbreviations	V
List of Tables	vi
List of Figures	vii
I. 서 론	01
II. 이론적 배경	04
1. 해조류	04
1) 갈조류	06
(1) 갈조류의 종류 및 특징	06
(2) 갈조류의 잠재적 건강 증진 효과	06
2) 다시마 (<i>Laminaria japonica</i>)	07
(1) 다시마의 조성	07
(2) 다시마의 생리활성	12
3) 해조류 유래 다당류	13
2. 염증 관련 대사성 질환	15
3. 대식세포	15
4. 대식세포에서의 염증성 사이토카인 및 염증 대사경로	16
III. 연구 내용 및 방법	20
1. 시료 준비	20
1) 다시마 물 추출물	20
2) 다시마 유래 다당류 분리·정제	20
2. 실험 방법	24
1) 다시마 추출물과 다시마 다당류의 이화학적 실험	24

(1) 총 폴리페놀 함량.....	24
(2) 항산화능 측정.....	24
2) 세포 배양.....	26
3) 세포 생존율 측정.....	26
4) Nitric oxide (NO) 생성량 측정.....	27
5) RNA 분리·정제와 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).....	27
6) 염증관련 사이토카인 생성량 측정 (ELISA).....	28
3. 통계 분석.....	29
IV. 연구 결과.....	30
1. 다시마 물 추출물 및 다시마 유래 다당류의 이화학적 실험 결과.....	30
1) 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 총 폴리페놀 함량.....	30
2) 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 항산화 효과.....	32
2. 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 세포독성.....	36
3. 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류가 NO 생성에 미치는 영향.....	38
4. 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 항염증 관련 유전자 발현에 미치는 영향.....	40
5. 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류가 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향.....	46
V. 고찰.....	48
VI. 요약 및 결론.....	51
VII. 참고문헌.....	53
< 국문초록 >.....	66

<Abstact>

**Comparison of Biological Characteristics and Immunomodulatory Effect between
Purified Polysaccharides and Water Extract from
*Laminaria Japonica***

Jiamei Cui

Department of Food Science & Nutrition Graduate School

Jeju National University

Supervised by professor Yunkyong Lee

Inflammation is the complex biological protective response of body tissues to harmful stimuli, such as pathogens, damaged cells, or irritants. Prolonged low-grade inflammation results in chronic diseases including diabetes, obesity, inflammatory bowel disease, pulmonary disease and cancer. Pharmaceutical substances have been used to treat such diseases however there have been a wide range of side effects. Therefore, not only to minimize the side effects but also to positively regulate inflammation to prevent the chronic diseases, compounds from natural sources/foods have drawn lots of attentions. Seaweed has been one of the attractive materials, which with potential to be exploited in human health applications. *Laminaria japonica* (LJ), a brown seaweed has served as a source of food, medicine, pigment, and livestock fodder with various essential nutrients and biological activities including anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-proliferative, anti-tumor, anti-diabetic and others. It is well-documented that components and functions of extracts are highly dependable to its solvents. In consideration of potentially bioactive components in seaweeds, seaweed-derived dietary fiber has been intensively examined due to its richness, various forms, and functionalities. We hypothesized that polysaccharide purified from LJ (LJPS) is a responsible component contributing the beneficial effects of LJ,

especially its anti-inflammatory property. Therefore, in this study we compared water extract from LJ (LJE) and LJPS on their anti-oxidant and immunomodulatory effects by using *in vitro* model.

Total polyphenol contents were measured using Folin–Ciocalteu method. Antioxidant activity was evaluated using the ABTs and DPPH assay. Cell viability was measured using MTT assays in mouse macrophages, RAW 264.7 cells. Nitric oxide (NO) assay, ELISA, and real-time PCR were performed to investigate the immunomodulating effect of LJE and LJPS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with LJE or LJPS.

As a result, we observed that LJE had a stronger ABTs radical scavenging activity than LJPS. Cellular toxicity of LJE was comparatively higher than that of LJPS in RAW 264.7 cells. LJE showed cellular toxicity from concentration 10 µg/mL, and no significant cytotoxicity was observed with LJPS upto 50 µg/mL in RAW 264.7 cells. Moreover, LJPS itself significantly enhanced the production of NO in RAW 264.7 cells. On the other hand, both LJE and LJPS reduced the production of NO, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) expression by LPS stimulated RAW 264.7 cells.

Taken together, it was confirmed that polyphenols were lost through polysaccharide purified from LJ. Based on the antioxidant activity of LJPS, we were able to conclude that the antioxidant activity was not the main biological property of LJPS. LJE appeared to have an anti-inflammatory effect, whereas LJPS had a biphasic immunomodulatory effect in RAW 264.7 cells. Overall, LJE and LJPS presented a promising natural source of food additives to regulate immune responses.

List of Abbreviations

ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline

FBS: Fetal bovine serum

IL-6: Interleukin-6

IL-10: Interleukin-10

IL-1 β : Interleukin-1 β

IBDs: Inflammatory bowel diseases

LJ: *Laminaria japonica*

LJE: *Laminaria japonica* water extract

LJPS: *Laminaria japonica* derived polysaccharides

LPS: Lipopolysaccharide

M1: Classically activated macrophages

M2: Alternatively-activated macrophages

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MCP-1: Monocyte chemotactic peptide 1

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NO: Nitric oxide

NF- κ b: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

P/S: Penicillin/streptomycin

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

TLR4: Toll-like receptor 4

List of Tables

Table 1. Mineral contents of <i>Laminaria japonica</i>	08
Table 2. The potential health benefits of brown seaweed, <i>Laminaria japonica</i>	09
Table 3. Primer sequences for RT-PCR	28
Table 4. Total polyphenol contents of LJE and LJPS	31

List of Figures

Figure 1. Potential health-beneficial effects and various applications of seaweeds·····	05
Figure 2. A flow diagram of LJ water extract preparation·····	22
Figure 3. A flow diagram of Purified LJ polysaccharide preparation·····	23
Figure 4. ABTS radical scavenging activity of LJE and LJPS·····	33
Figure 5. DPPH radical scavenging activity of LJE and LJPS·····	35
Figure 6. Cellular toxicity of LJE and LJPS in RAW 264.7 cells·····	37
Figure 7. Effect of LJE and LJPS on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells·····	39
Figure 8. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced TNF- α expression in RAW 264.7 cells·····	41
Figure 9. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced IL-6 expression in RAW 264.7 cells·····	42
Figure 10. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced IL-1 β expression in RAW 264.7 cells·····	43
Figure 11. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced MCP-1 expression in RAW 264.7 cells·····	44
Figure 12. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced IL-10 expression in RAW 264.7 cells·····	45
Figure 13. Effect of LJE and LJPS on inflammatory cytokine production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells·····	47

I. 서론

염증이란 체내의 면역세포가 외부로부터 물리적, 화학적 자극이나 세균감염을 인지하여 다양한 염증매개 물질을 분비함으로써 손상된 조직을 재생하려는 우리 몸은 자연 방어 기전이다. 만성 염증 상태가 지속되면 신체의 여러 기관에 기능 장애가 유발될 수 있으며, 이로 인하여 암, 당뇨, 동맥경화와 같은 심혈관계 질환 등 다양한 질병이 야기된다 [1-3].

염증을 치료하기 위해 다양한 항염증 제제가 개발 되어 왔으며, 현재 보편적으로 사용되고 있는 항염증 제제로는 크게 스테로이드계 항염증제 (steroid anti-inflammatory drugs)와 비스테로이드계 항염증제 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)로 나뉜다 [4]. 이러한 항염증 제제들은 염증 증상을 완화하는 동시에 다양한 부작용 (예, 위장관 질환 [5-7], 심혈관질환 [8], 신장질환 등)을 유발하기도 한다 [9, 10]. 이에 학계에서는 항염증 약제의 원료로 상대적으로 부작용이 적은 천연유래 원료에 많은 관심을 가지고 다양한 연구를 지속해 왔다.

다양한 천연물질 중 해조류는 아시아의 일부 국가에서만 식용으로 사용되고 있고 유럽이나 북미에서는 식품이나 의약품의 첨가물 정도로만 사용되고 있다 [11, 12]. 하지만 최근 해조류의 잠재적인 건강 증진효과에 대한 지속적인 연구결과로 서양에서도 이에 대한 관심이 높아지고 있다 [13]. 해조류는 보유하고 있는 색소의 종류에 따라 크게 갈조류, 녹조류, 홍조류로 나뉘며, 영양학적으로는 열량이 낮으며 비타민, 무기질, 단백질, 탄수화물, 식이 섬유, 고미네랄 (요오드, 칼슘), 그 외 생리활성물질 (예, 다당류, 폴리페놀, 다가 불포화 지방산) 등을 풍부한 것이 특징적이다 [14-17]. 이러한 해조류의 영양성분은 서식하는 지역이나 계절 등 외부요인에 영향을 받는 것으로 알려져 있다 [18]. 지금까지 많은 선행 연구들을 통해서 해조류의 다양한 잠재적 건강증진 효과, 항암, 항산화, 항염증, 항종양, 항비만과 장 건강 개선 [19, 20]등이 보고된 바 있다.

갈조류인 다시마 (*Laminaria japonica*)는 한국, 중국, 일본 등 아시아 국가들에서 흔히 식재료 및 전통약제로 이용되며, 저칼로리 식품으로 비타민, 미네랄, 식이 섬유 및 폴리페놀 등 생리학적 활성 물질을 함유하고 있다. 지금까지 보고된 다시마의 효능으로는 항비만 [21], 항종양 [22], 항염증, 항당뇨 [23], 항동맥경화 [24], 면역조절 [25], 세포자멸 억제 (anti-apoptosis) [26], 항바이러스 [27], 항응고 [28]와 항방사선 [29] 등의 건강기능 효과에 있으나, 아직 구체적으로 다시마의 어떤 성분 때문에 이러한 유익한 효과가 나타나는지와 이에 따른 기전의 규명에 더 많은 연구가 필요하다.

해조류로부터 기능성 성분을 발굴하기 위해 여러 가지 용매 및 효소 처리 기법 등을 적용한 추출 방법이 연구되어 오고 있다. 대표적인 추출방법으로는 효소 추출 (enzyme-assisted extraction), 마이크로파 추출 (microwave-assisted extraction), 초음파 추출 (ultrasound-assisted extraction), 초임계 유체 추출 (supercritical fluid extraction), 가압 액체 추출 (pressurized liquid extraction) 등이 개발되어 이용되고 있다 [12, 30-34]. 다양한 추출방법은 추출물이 함유하는 기능성 성분에도 큰 차이를 보인다 [35]. 예를 들어, 해조류에서 다른 추출방법을 이용한 추출물질은 이화학적 특성 (예, 폴리페놀 함량, 항산화 능력, 프리바이오틱스 (prebiotics)로의 잠재성, α -glucosidase 억제효과 등)의 자명한 차이를 보인다 [36]. 보편적으로, 식물의 물 추출물보다는 효소를 이용해서 획득한 추출물 (enzyme-assisted extraction)은 폴리페놀의 함량이 높을 뿐만 아니라, 프리바이오틱스로의 잠재성, 항산화 효과, 항당뇨 효과 등에서 뛰어난 능력을 보여준다 [36, 37]. 아직까지 정확하게 어떤 표적물질이 이러한 추출물의 개선된 이화학적 효과에 관여하는지에 대한 정확한 인과관계는 밝혀지지 않았으나, 효소를 이용한 추출법에서는 가수분해작용을 통해 해조류의 세포벽 파괴가 가능하므로 물 추출물과 비교하여 상대적으로 다양한 다당류, 펩티드 또는 아미노산의 추출되는 특징이 부분적으로 기여할 것이라고 사료된다.

선행연구에 의하면 해조류 추출물 (갈조류 중에서 미역 (*Undaria pinnatifida*), 다시마 (*Laminaria japonica*), 모자반 (*Sargassum fulvellum*), 톳 (*Hizikia fusiforme*) 등)의 전지방 세포에서 지방 세포로 분화과정에 해조류 추출물이 미치는 영향과 관련 연구에서 물 추출물과 에탄올 추출물 중에서 물 추출물이 지방분화 억제효과에 더욱 탁월하였다 [38]. 해조류 물 추출물이 지방세포 분화에 미치는 영향에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않지만, 해조류 에탄올 추출물에 비해 물 추출물에 함유되어 있는 특정 생리활성 성분이 영향을 미칠 것으로 사료된다. 즉, 추출에 이용되는 용매의 종류에 따라 추출물에 함유되어 있는 성분의 차이가 크며, 해조류 물 추출물에는 에탄올 추출물에 비해 다당류 성분의 함량이 높다고 알려져 있다. 다당류의 다양한 생리활성 효과들이 연구되어 있으나, 아직까지 해조류 (다시마)의 물 추출물과 해조류에서 추출한 정제 다당류의 생리활성의 직접적인 비교에 대한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구의 목적은 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 이화학적 특성의 비교와 항염증에 초점을 둔 생리활성 효과를 비교하고 그 기전에 대해 연구해 보고자 한다.

II. 이론적 배경

1. 해조류

바다의 중요한 생명 자원 중 하나인 해조류는 보통 연안 지역에 있으며 다양한 모양, 크기, 색상 및 구성을 가진다. 해조류는 최대 180 m의 심해 지역, 하구 (estuaries) 및 black water에 있는 자갈, 암석, 죽은 산호, 조개 및 식물 재료표면에서 붙어 있으며 비교적 얇은 바위 해안 지역의 바닥에 붙어 서식한다 [39].

해조류는 서식하고 있는 바다의 깊이에 따라 광합성의 정도 차이로 인해 생성되는 색소의 양에 따라 녹조류 (Chlorophyceae), 갈조류 (Phaeophyceae), 홍조류 (Rhodophyceae)로 분류된다 [40]. 해조류의 분류군 별 출현비율은 녹조류 16.4%, 갈조류 25.0%, 홍조류 58.6%로 분포 되어있다 [41]. 해조류는 자신의 몸 색과 보색 관계에 있는 빛을 주로 이용하여 광합성을 하도록 적응되어 있어 녹조류는 투과력이 약한 적색광을 주로 광합성에 이용해서 수심이 얇은 곳에서 서식하고 홍조류는 투과력이 강한 청색광을 주로 광합성을 이용해서 깊은 곳에서, 갈조류는 그 둘 중간 깊이에서 서식한다 [42]. 한국에서 일반 대중이 흔하게 섭취하는 해조류로는 다시마, 미역귀, 김, 미역, 모자반, 매생이, 청각, 꼬시래기 등이 대표적이다.

해조류는 영양적인 가치가 높은 식품으로 갈조류인 다시마는 단백질 8-15%, 식이 섬유 10-41%, 탄수화물 48%, 지방 1.0%를 함유한다. 녹조류인 청각은 단백질 8-11%, 식이 섬유 5.1%, 탄수화물 39-67%, 지방 0.5-1.5%를 함유한다. 홍조류인 꼬시래기는 단백질 6.9%, 식이 섬유 24.7%, 지방 3.3%를 함유한다 [14]. 그 외에도, 해조류는 미네랄 (요오드, 칼슘), 비타민 (Vitamin C, E, B₃), 색소 등도 풍부하고 동물의 정상적인 성장과 조직 복구에 필요한 비타민 A의 전구체인 베타-카로틴을 함유하고 있다 [43]. 이러한 해조류는

식용으로뿐만 아니라 산업 응용, 사료 첨가제, 비료, 염료 등 분야에서 광범위하게 사용되고 있다 [17, 44, 45].

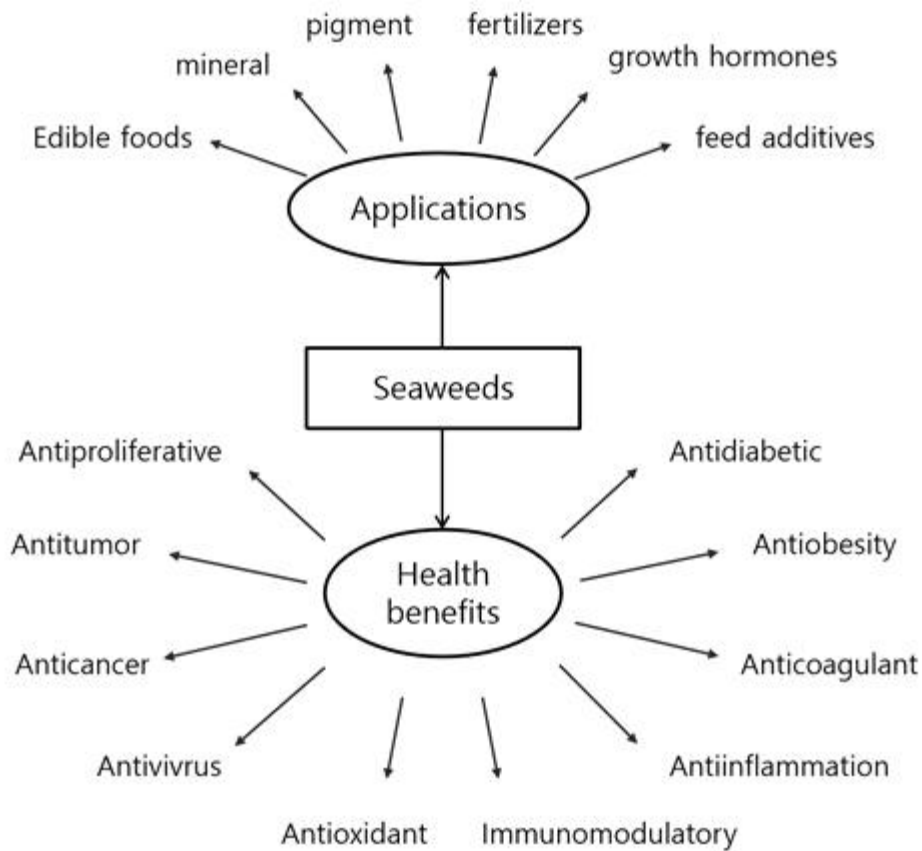


Figure 1. Potential health-beneficial effects and various applications of seaweeds

지금까지 해조류는 다양한 잠재적인 건강증진효과가 보고되어 왔으며, 식품, 시료, 비료, 식품 첨가물 등 여러 분야에 적용이 가능하다 (Figure 1). 특히 우수한 해조류의 항증식, 항종양, 항암, 항바이러스, 항산화, 면역조절, 항염증, 항응고, 항비만, 항당뇨 등의 효과가 지금까지 보고되었다 [20, 46-51].

1) 갈조류

(1) 갈조류의 종류 및 특징

바다 생태계에서 중요한 역할을 수행하는 갈조류는 1,500종이 넘으며, 대표적인 바다생물의 먹이로 사용된다. 이러한 갈조류는 온대, 열대 및 극지 해안을 따라 자라는 다세포 해양 생물이다 [52, 53]. 갈조류는 주로 중국, 한국, 일본 등 아시아 나라에서 식용과 약제로 사용되어 왔다 [54, 55]. 예를 들어, 주성분인 툿 (*Sargassum fusiforme*), 중국 전통 약제인 “Modified Haizao Yuhu Decoction” (海藻玉壶汤, 해조옥호탕)가 *in vivo* (autoimmune thyroiditis rats)에서 잠재적인 면역조절 (immunomodulatory)의 역할을 한다고 보고된 바 있다 [56]. 대표적인 식용 갈조류는 다시마, 툿, 미역 등이 있으며, 주로 반찬, 샐러드, 무침, 국 등의 형태로 식탁에 오른다.

특히 해조류는 식이 섬유, 다당류 (건조물의 약 40%)를 풍부하게 함유하고 있는데, 갈조류의 대표적인 다당류로는 laminarin, fucoidan, alginates 등이 있다 [57].

(2) 갈조류의 잠재적 건강 증진 효과

지금까지 다양한 갈조류의 잠재적 건강 증진 효과가 보고되어 왔다. *Ectocarpus*에 함유되어 있는 β -D-mannuronic acid (M)-rich와 α -L-guluronic acid (G)-rich alginates는 세포벽 강화에 도움을 준다고 알려져 있으며 [58], *Phlorotannins*는 UVB (Ultraviolet B: 290-320 nm)에 의한 손상에 효과적인 보호제로 제안 된다 [59]. 또한 *Bifurcaria bifurcate*는 *in vitro* 파킨슨 질병 모델에서 항산화 능력을 보여주었다 [60]. 갈조류에서 발견된 다당류인 *Laminarin*는 인간 결장암 성장 억제 효과를 보고된 바 있다 [57]. 모자반은 항염증, 항 알레르기 활성, 항균제, 항바이러스 활성, 항암, 간 보호,

피부 미백, 알츠하이머병 치료, 혈당 저감, 위 보호, 항산화제 등 약리적인 생리활성을 가진다고 알려져 있다 [55]. *Kjellmaniella crassifolia*는 murine hepatocarcinoma Hca-F 세포로 종양을 접종하였을 때 종양의 성장을 억제 할 수 있음이 확인되었다 [61]. 또 다른 연구에서는 갈조류 5종 [*Eisenia bicyclis* (Arame), *Kjellmaniella crassifolia* (Gagome), *Alaria crassifolia* (Chigaiso), *Sargassum horneri* (Akamoku), *Cystoseira hakodatensis* (Uganomoku)]의 항산화 능력을 확인하였으며, 이를 통해 갈조류가 천연 항산화제의 대체 공급원의 가능성을 제시하였다 [62]. *Turbinaria conoides* 유래 후코이단은 농도 의존적으로 폐암세포의 성장을 억제하였다 [63]. 추가적으로 *Costaria costata* 유래 carrageenan는 유도하는 마우스 꼬리 모델 (carrageenan-induced mice tail model)에서 혈전 형성을 예방이나 감소시키는 효과가 보였다 [64]. *Fucus distichus*는 Toll-like receptors (TLR)-4와 TLR-9의 함량을 감소시켰고 지질 축적이 55% 및 유리 글리세롤 농도 28-45% 감소시켰으므로써 *Fucus distichus*의 항염증과 지질대사 개선 효과를 규명하였다 [65].

2) 다시마 (*Laminaria japonica*)

(1) 다시마의 조성

갈조류인 다시마 (*Laminaria japonica*)는 다시마속의 식물로 암갈색을 띠고 뿌리와 줄기, 잎 3부분으로 된 대형의 다년생 해조류이다. 길이는 1.5~3.5 m, 너비는 25~40 cm 정도로 수확 시기는 5~6월이다. 현재 한국 국내 생산량은 약 200-300 kt으로 매년 증가하고 있다 [66]. 다시마는 국내산의 주요 해조류 중 식이 섬유소 (다당류) 함량이 10-41%로 높게 나타났다 [67]. 이렇게 풍부한 다당류를 함유하고 있는 다시마로부터 발견된 대표적인 다당류로는 laminarin, fucoidan, alginates의 3종이 있다. 다시마는 탄수화물 48%, 단백질 8-15%, 지방 1.0%, 식이 섬유 10-41%를 함유하고 있으며, 무기질의 함량도 풍부하다

(Table 1) [14, 67].

Table 1. Mineral contents of *Laminaria japonica* (mg/100 g dry weight)

Mineral	Contents (mg/100 g dry weight)
K	1300-12600
Ca	500-3000
Mg	500-2000
Na	900-6000
I	200-1000
P	150-800
Fe	4-80
Zn	0.6-1.82
Mn	0.29-11.1
Cu	0.1-1.4

Data collected by [45, 68-70]

다시마는 다른 해조류처럼 무기질 (나트륨, 칼륨, 인, 칼슘, 마그네슘, 철, 요오드) 함량이 풍부하며, 특히 요오드의 함량이 200-1000 mg/100 g dry matter로 타 해조류보다 훨씬 더 높은 수치를 나타낸다 [68].

다시마는 1,400년부터 중국에서 의학책에서 기록되어 있고 그에 식용가치를 높게 평가하였다 [71]. 다시마는 중국 전통 약제로써 갑상선, 비뇨 질환, 부종, 위 질환, 치질 및 항문 누공 등 질환들에 대한 치료효과가 있다고 알려져 있다 [54].

Table 2. The potential health benefits of brown seaweed, *Laminaria japonica*

	Biologically Active Substance	Model	Extraction method	Treatment condition	Activity/ Results	Ref
<i>in vitro</i>	Crude <i>Laminaria japonica</i> polysaccharides (LJP)	RAW 264.7 cell	Hot water	50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 20 hr	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: immunostimulant activity ◆ NO, TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 \uparrow ◆ Translocation of NF-κB, p65 \uparrow ◆ Phosphorylation of IκBα, ERK1/2, JNK1/2 and P38 \uparrow 	[25]
	Glycoprotein from <i>L. japonica</i> (LJGP)	AGS gastric cancer cells, HepG2 liver cancer cells, and HT-29 colon cancer cells	Water extract	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 hr	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: anti-proliferative effects ◆ Inhibited the proliferation of several cancer cell lines in a dose-dependent manner ◆ The expression of Cdk2, cyclin E, cyclin D1, PCNA, E2F-1, and phosphorylated pRb \downarrow 	[72]
	<i>L. japonica</i> n-hexane fraction (LHF)	RAW 264.7 cells	Ethanol extract	5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 25 hr	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: anti-inflammatory activity ◆ NO, PGE2, TNF-α, IL-1b, and IL-6 \downarrow. ◆ Regulated by NF-κB inactivation through inhibition of IκB-α, MAPKs, and Akt phosphorylation 	[73]
	<i>L. japonica</i> roots	RAW 264.7 cells	Ethanol extract	0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 hr	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: anti-inflammatory activity ◆ NO, IL-6, TNF-α, and IL-1β \downarrow 	[66]

<i>in vivo</i>	Water extract	Male C57BL/6N mice, mouse derived C2C12 myoblast cell line	Water extract	5% freeze-dried LJ or HF for 16 weeks	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: anti-diabetic effects and anti-inflammatory effects ◆ Inhibited α-glucosidase activity in a dose-dependent manner ◆ Phosphorylation of protein kinase B and AMP-activated protein kinase ◆ Glucose uptake \uparrow, TNF-α \downarrow, (IL)-6 and IL-10 \uparrow 	[23]
	<i>L. japonica</i> polysaccharide (LJP)	Female Kunming mice The murine H22 hepatoma cell line	Hot water	50, 100 or 150 mg/kg for 14 days	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: anti-tumor activity ◆ IL-2 and TNF-α \uparrow, serum VEGF level \downarrow 	[22]
	Fucoidan polysaccharide sulfuric acid ester (FPS)	Male Sprague-Dawley (SD) rats	Hot water	0.03, 0.1, 0.2, 0.4 g/kg for 28 days	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: Hypolipidemic effect ◆ TC, TG, and LDL-C concentrations \downarrow, HDL-C level \uparrow, the activities of lipid metabolic enzymes (LPL, HL, and LCAT) \uparrow 	[74]
	The crude polysaccharides of <i>L. japonica</i> (LP)	Male Kunming mice	Methanol extract	Group LDP, 100 mg/kg/day, group MDP, 200 mg/kg/day, group HDP, 400 mg/kg/day for 12 weeks	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: hypolipidemic activity ◆ Total serum cholesterol, triglycerides, high density lipoprotein-cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol in serum \downarrow ◆ Serum lipids level and enhancement of serum antioxidant enzyme activities \downarrow 	[75]
	<i>L. japonica</i> Areshoung ethanol extract (LE)	Male Sprague-Dawley rats	Ethanol extract	100, 200, or 400 mg/kg for 6 weeks	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: anti-obesity activity ◆ Body weight gain, food intake, lipid levels in serum and liver, and size and number of adipocytes \downarrow 	[21]

<i>in vivo</i>	Fucoidan	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) embryos The MDA-MB-231 and HCC1806 human breast cancer cell lines	-	0, 1, and 2 mg/mL for 48 hr 0, 1, and 2 mg/mL for 24 hr	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: anti-tumor effect ◆ Suppressed activation of MAPK and PI3K followed by inhibition of AP-1 and NF-κB signaling in triple-negative breast cancer (TNBC) ◆ Attenuation of invasiveness and pro-angiogenesis in TNBC 	[76]
	<i>L. japonica</i> ethanol extract	Male Sprague-Dawley rats	Ethanol extract	200 mg/kg for 6 weeks	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Activity: anti-hyperlipidemic and anti-arteriosclerosis activity ◆ Total lipid and triglyceride levels in the serum ↓, total cholesterol and low density lipoprotein-cholesterol levels ↓ ◆ The atherosclerosis index and superoxide dismutase in blood lipids ↓ 	[77]

(2) 다시마의 생리활성

다시마의 면역자극 활성, 항 증식, 항염증, 항 당뇨, 항비만 및 인슐린 저항성 감소, 항종양, 항 고지혈증, 항 동맥 경화 등의 다양한 생리활성은 *in vivo* 와 *in vitro* 모델을 이용한 연구들을 통해 보고 되어왔다 [78]. 이러한 다시마의 생리활성 관련 선행연구들을 세포 실험과 동물 실험으로 분류하여 Table 2 와 같이 정리하였다. 그 내용을 살펴보면 아래와 같다.

Jing Wang 외 (2010)는 다시마의 부위, 추출하는 분자량 크기, 황산염의 함량 등에 따라 다시마 유래 추출물의 과산화물 라디칼 소거능, 항응고능과 positive correlation 등 생리활성 효능에 차이가 있음을 보여주었다 [79]. 예를 들어, 다시마 유래 저 분자량 fucoidan 은 중간 분자량 fucoidan 에 비하여 항 혈전 효과에 차이를 보였으며, 저 분자량 fucoidan 이 경구 흡수 및 항 혈전활성이 중간 분자량의 fucoidan 과 비교하여 더 우월하다고 보고하였다 [80]. 다시마 유래 다당류인 fucose 는 다시마의 뿌리보다 잎에 그 함량이 더 많으며, 특히 3, 4 월 수확된 다시마에서 유래된 fucose 함량은 제일 낮게 나타나며 광합성에 의해서 그 함유량이 증가한다고 보고되었다 [81].

다시마 유래 다당류에 대한 다양한 선행연구들이 발표되어 왔다. 다시마 유래 저 분자량의 fucoidan 은 항산화, 항염증 효과가 탁월하며, 아세트산에 의해 유도된 위궤양에 대한 치료 효과를 보였다 [82]. 다시마 유래 수용성 균질 다당류 water-soluble homogeneous polysaccharide (LJP-31)는 nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) 및 interleukin-10 (IL-10)의 생성량을 상승시킬 수 있었고 toll-like receptor 4 (TLR 4)를 통해 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 및 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ b) 신호 전달 경로의 활성화를 통한 면역활성을 유도하였다 [25]. 또한, 다시마 유래 fucoidan 은 300 mg/kg 으로 Wistar rat 에 제공되었을 때, 독성없이 고지혈증을 저해하는 효과를 보였다 [83]. 더불어 fucoidans 은 대장균

Escherichia coli (E. coli)와 황색포도상구균 *Staphylococcus aureus* (S. aureus)의 증식에 대한 억제 효과가 있어 실제로 일상생활 중에서 항생제로써의 효과도 보고된 바 있다 [84]. 또 다른 다시마 유래 다당류인 알긴산 (Alginic acid)은 *Laminaria japonica* Aresch의 세포벽 및 세포 간 공간에 위치하며, 이 화합물의 염은 주로 calcium alginates의 형식으로 존재한다.

이외에도 다시마는 식품, 화장품, 흡착제, 사료 등의 재료로도 많이 이용되고 있다. 특히 다시마 유래 다당류는 주름 개선, 미백, 보습, 자외선 차단, 항산화 및 항염증 작용 등 피부보호 효과가 입증되었다 [85]. 다시마는 잠재적 생체 흡착제로서 중금속 오염된 수용액에서 중금속 제거능을 가진다 [86]. 또한 다시마는 오리의 사료에 항생제 대체제로도 사용되고 있다 [87].

3) 해조류 유래 다당류

다당류는 글리코사이드 결합에 의해 결합된 단당류 단위체의 긴 사슬로 구성된 중합체 탄수화물 분자이며, 가수분해 작용을 통해 단당류 또는 올리고당으로 분해된다. 식물 등의 원재료에서 추출방법 (추출용매, 효소 이용 등)에 따라 추출되는 다당류의 분자량과 구조에 자명한 차이를 보인다. 다당류의 생물활성은 분자량, 단당류 조성, sulfate 함량과 황산 에스테르 그룹의 위치 등과 관련성을 보인다 [33]. 특히 sulfate 함량은 과산화물 라디칼 소거능, 항응고능과 양의 상관관계가 있음이 보고된 바 있다 [79].

장내 미생물의 다양한 기능들이 밝혀지면서, 미생물의 먹이인 다당류, 즉 프리바이오틱스에 대한 연구가 큰 관심을 받고 있다. 특히 상대적으로 부작용의 위험이 적은 천연 식물 유래 다당류에 대한 연구들이 주목을 많이 받고 있다. 특히, 그 중에 해조류 유래 다당류는 생물 의학적 가치가 많이 알려져 있다. 현재까지 보고된 해조류 유래 다당류의 다양한 건강증진 효과들이 보고되어 왔으며, 예를 들어 targeted 약물 전달, 잠재적인 상처 치료 능력, 잠재적인 항암

능력, 조직 엔지니어링 측면 및 해조 다당류의 자외선 보호 기능성 등에 대한 효과가 있다 [88]. 요즘 10 년간에 다당류는 장 건강 증진, 간암 치료에 대한 효능을 연구학자들에게 많이 연구 되고 있다 [89, 90]. 연구에 따라 *Ficus carica* L. Fruit 다당류와 물 추출물은 모두 건강 의학 및 식품 산업에 적용될 수 있지만 물 추출물보다 다당류에서 superoxide radical 과 hydroxyl anion radical 의 라디칼 소거능력이 우수하였다 [91].

다당류의 주요 성분인 식이 섬유소는 중요한 기능들을 통해 인간의 영양을 간접적으로 지원하면서 장 건강을 촉진시킨다. 이를 통해 대장암, 장염 등 장 질환의 발병율을 감소시킬 수 있다. 육상 식물에서 추출하는 식이 섬유소보다는 해조류에서 추출하는 식이 섬유의 함량은 비슷하거나 더 높게 나타났다 [92]. 이들 식이 섬유소 중에는 55-70%는 수용성 식이 섬유소로, 주로 agar, alginates, carrageenan, fucoidan, laminarin 등을 포함한다 [93]. 갈조류는 주로 alginates, fucoidan, laminarin 등을 포함되었고, 녹조류는 주로 ulvan 을 포함하고, 홍조류는 주로 agar, carrageenan, porphyran 을 포함한다.

Alginate 는 갈조류의 세포벽을 구성하는 선형 산성 다당류이고 uronic acids 두개 (즉, β -d-mannuronate (M) 및 α -l-guluronate (G))로 구성되며, 이들은 서로 다양한 blocks 으로 무작위로 배열된다 [94]. Alginate 와 fucoidan 는 중금속 chelation 의 역할을 한다 [53].

Fucoidan 은 복잡한 함황다당류로 다양한 갈조류의 세포벽 기질에서 발견된다. 또한, Fucoidan 은 l-fucose 과 sulfate ester 그룹을 함유하는데 [16], *in vitro* 와 *in vivo* 모델에서 세포 사멸을 유도, 혈관 신생 억제, 지방암의 전이 억제 능력 등이 보고되었다 [95-97].

Laminarin은 액포에서 존재하며, (1,3) - β - d - glucopyranose residues로 구성되어 있으며 6 - O - branching과 β - (1,6) - intrachain links을 함유는 구조적 특징을 가진다 [98].

2. 염증 관련 대사성 질환

염증반응은 생물체 내부나 외부에서 다양한 감염 및 부상에 대한 방어 메커니즘이고 열, 부기, 통증 및 다양한 기능 장애를 유발할 수 있다. 일반적으로 염증반응은 인체에 대한 유익적인 방어 반응이지만 때로는 염증은 신체의 면역체계에 알레르기 반응을 일으키고 자체의 조직 및 세포를 공격할 수 있다. 그리하여 아나필락시스, 건초열, 습진 및 천식과 같은 알레르기 장애를 일으킬 수 있다.

염증반응은 급성염증과 만성염증으로 나눌 수 있다. 급성 염증은 암, 동맥경화, 뇌신경 질환 등 만성 염증으로 전환했을 때 여러 만성 질환이 유발할 수 있다. 급성 폐 염증은 폐렴 및 급성 호흡 곤란 증후군을 포함하고; 만성 염증에는 천식과 만성 폐쇄성 폐질환 (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)가 포함된다. 급성 염증은 사망을 유발할 수 있는 경우도 있다. 염증의 지속은 조직을 손상시키고, 조직의 괴사는 추가적인 염증을 유발할 수 있기 때문에 내재적인 위험이 될 수 있다 [99]. 만성 염증은 비만, 제2형 당뇨병, 치아 pulp 손상, 염증성 장 질환 (inflammatory bowel diseases, IBDs), 지방간, 동맥 경화증, 천식 및 알츠하이머병 등을 유발시킬 수 있다 [100-104]. 추가적으로 박테리아 및 바이러스 감염에 의한 염증의 유도가 암 위험을 증가시킬 수 있다. 따라서 염증성 대사 질환에 대한 예방과 치료는 중요한 분야이다.

3. 대식세포

선천성 면역에 관여하는 대표적인 면역 세포인 대식세포는 염증 반응을 유발하는 데 중요한 역할을 하고 탐식, 소화, 항원이 침입하면 섭취하거나 독소를 분비하여 파괴하는 기능을 담당할 뿐만 아니라 염증성 분자에 의해서 면역체계 활성화를 시킬 수 있다. 대식세포는 탐식작용 (phagocytosis)을 통해

병원체를 직접으로 사멸시키고, 염증성 사이토카인을 분비하여 간접적으로 병원체를 죽일 수 있다 [105]. 마우스 대식세포인 RAW 264.7는 염증 유도 모델에서 많이 이용되고 있다.

대식세포는 그 성질에 따라 크게 classically activated macrophages (M1)과 alternatively-activated macrophages (M2)로 나뉜다. M1 대식세포는 세포 증식을 억제하고 조직 손상을 일으키고 염증성 세포 (pro-inflammatory cells)로, 종양 활성 (tumoricidal activity) 성질을 가진다. 또한, M1 대식세포는 T helper 1 (Th1) 세포 반응 촉진하고 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, toxic nitric oxide (NO), Type I IFN, CXCL1-3, CXCL-5 과 CXCL8-10 등)을 생산한다. 그리하여 염증 부위로 더 많은 백혈구를 모집하고 염증 상태를 향상시킨다. 반면에, M2 대식세포는 세포 증식 및 조직 복구를 촉진하고 조직 완전성을 유지하는 역할을 한다. M2 대식세포는 면역 억제세포 (immunosuppressive cells)로 helper 2 (Th2) 반응을 촉진하면서, IL-10 같은 항염증성 사이토카인과 trophic polyamines을 많이 방출한다 [106-110]. 즉, M2 대식세포는 염증을 감소시키고 조직을 복구(repair)를 돕는다.

대식세포가 자극을 받아서 (이물질에 대응할 때) nitric oxide (NO), monocyte chemotactic peptide 1 (MCP-1), 또는 염증성 사이토카인, tumor necrosis factor- α (TNF- α), 인터루킨 (interleukin-6 (IL-6) 및 interleukin-1 β (IL-1 β) 등 염증성 인자들을 생성과 방출을 돕는다 [111-115].

4. 대식세포에서의 염증성 사이토카인 및 염증 대사경로

Lipopolysaccharide (LPS)는 내독소 (endotoxin)로 지질과 다당류로 구성되는 커다란 분자이다. LPS는 대식세포의 염증을 유도할 수 있고 염증신호기전들을 활성화시킬 수 있으므로 염증반응을 연구할 때 흔하게 사용된다.

Nitric oxide (NO)의 생성은 생리적 조절 과정, 숙주 방어, 염증 및 면역의 조절에 중요한 역할을 한다. 포유동물 세포에 존재한 NO는 산화질소 합성효소 (nitric oxide synthases, NOS)에 의해서 조절하고 3종류 isoforms (endothelial NO synthase (eNOS), neural NO synthase (nNOS) 및 inducible NO synthase (iNOS))가 알려져 있다. 대식세포에서 발현되는 주된 형태는 iNOS이다. 비정상적인 상황에서 NO 생성 증가는 전신 조직 손상을 유발할 수 있다는 것도 알려져 있다 [116]. 급성염증, 만성염증 등 질병은 대식세포 같은 염증성 세포가 생성하는 NO와 연관이 있다. 그래서 대식세포에서 NO 생성량을 억제하는 것은 염증성 질병을 치료하는 것에 대해 도움이 될 수 있다.

즉, NO는 염증성 질환 또는 부상 과정의 초기 단계에서 빠르게 유도되고 치유 과정을 조절한다. 그러나 NO가 과량 생산된 경우에는 오히려 염증성 질환을 더 악화시킬 수 있다. 염증 기전을 조절하는 사이토카인은 주로 염증성과 항염증성 사이토카인으로 나눈다. 염증성 사이토카인은 염증을 촉진하는 작은 분비 단백질로 대표적인 예로는 TNF- α 와 IL-1가 있다. 항염증성 사이토카인은 면역조절 분자로 IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IL-13 등이 해당된다 [117].

TNF- α 는 대표적인 염증성 사이토카인으로써 다른 염증성 사이토카인 (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8)의 유도를 통해 염증 조절에 중요한 역할을 한다 [118]. LPS의 자극으로 대식세포는 TNF- α 를 분비하고, 이는 순차적으로 IL-1과 IL-6의 분비를 자극한다 [119]. 즉, TNF- α 는 LPS와 같은 내독소 쇼크의 매개자이고 질병의 병리에 기여할 수 있다.

면역 시스템에서 큰 영향이 있는 IL-6는 다방면성 (pleiotropic) 사이토카인으로써 염증성과 항염증성 효과가 모두 가진다 [120]. 즉, IL-6는 면역 항상성, 조혈, 염증, 발달 및 신진 대사에 대한 필수적인 반응인자이다. 일반적으로 IL-6는 염증성 사이토카인으로 작용하지만, 근육에서는 운동으로 인해 IL-6가 유도될 수 있다 [121]. 근육 섬유에서 운동에 의해서 생성된

IL-6는 동맥경화의 지질개선이 보고된 바 있다 [122]. 즉, IL-6는 근육에서 TNF- α 가 유도하는 인슐린 저항성을 감소시킬 수 있으며, 운동 할 때 근육 조직에서 생성된 IL-6는 건강에 좋은 영향을 줄 수 있다. 흥미로운 점은 운동 후에 IL-6, TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인의 생성의 증가와 사이토카인 억제인자 (IL-1ra, sTNF-r1, TNF-r2) 및 항염증성 사이토카인 (IL-10)의 생성량도 증가시킨다. 즉, 동일한 사이토카인이라도 특정 조직과 상황에 따라 항염증과 염증성 기전을 통해 우리의 면역계 균형을 유지할 수 있다는 것을 알 수 있다 [123].

IL-10는 일반적으로 항염증성 사이토카인으로 알려져 있지만, 위에서 언급한 IL-6와 같이 염증성 사이토카인으로 활성을 가지는 양면성이 있다는 보고가 존재한다. 즉, IL-10는 T 세포, 단핵구 및 대식세포의 활성화를 억제한다. IL-10는 다기능 사이토카인으로써 대부분의 조혈 세포 유형에 다양한 영향을 미치고 면역조절하고 염증반응 중에서 중요한 역할을 담당한다 [124]. IL-10의 경우 항염증성 인자으로써 TNF- α 와 IL-6 등 염증성 사이토카인을 억제시킨다. IL-10은 항염증 효과가 있을 뿐만 아니라 CD4+, CD8+ T 세포 및 NK (natural killer, 자연 살해) 세포에서 면역자극의 작용의 기능도 담당한다 [125, 126]. IL-10의 농도가 너무 높거나 혹은 너무 낮아도 만성염증에 영향을 초래될 수 있는데, 이는 H Tilg외 16인의 연구결과에서 보여준 바와 같이 IL-10를 이용해서 Crohn's disease (CD)를 치료할 경우 사람에게 5-8 mg/kg/day로 처치하였을 경우 가장 효과적인 반면, 농도가 더 높으면 오히려 역효과를 유도하였다 [127, 128]. 이와 같이 적용되는 대상에 따른 혹은 질병에 따른 치료효과를 이루기 위해서는 사이토카인의 농도의 최적화 과정이 필수적이라 할 수 있겠다.

Monocyte chemotactic peptide 1 (MCP-1)는 C-C chemokine family중 하나로 주로 폐포 대식세포 (alveolar macrophages, AMs)과 T세포를 감염 및 염증 부위로 모집한 역할을 한다 [129]. 신장에 MCP-1함량의 증가는 신장

염증의 상승과 고혈압 등에 관련이 있고 근육에서 염증을 유도할 수 있다. 그 외에는 MCP-1은 당뇨병과 관련된 염증 과정의 주요 원인이고 인슐린 저항성 및 제 2 형 당뇨병 발병 과정에서 중요한 위험 인자로 밝혀졌다 [130, 131].

Ⅲ. 연구 내용 및 방법

1. 시료 준비

1) 다시마 물 추출물 (LJE)의 제작

실험에서 사용된 다시마 (*Laminaria japonica*, LJ)는 2016년 3-4월 제주시 전통시장에서 구입하여 세척, 탈염 및 동결 건조하여 -80°C 에 보관하였다. 다시마 물 추출물 (LJ extract, LJE)의 시료 제작 과정은 Figure 2와 같다. 동결 건조된 다시마 파우더 (30 g)를 1 L의 3차 증류수에 혼합하여 상온에서 24시간 교반 시킨 후, 진공 여과를 거쳐 0.5 L가 될 때까지 농축시켰다 (62°C). 최종적으로 LJE의 농축된 용액을 동결건조 시키고, 이를 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco, Gaithersburg, MD, USA)에 용해·여과하여 세포실험에 사용하였다.

2) 다시마 유래 다당류의 제작 (분리·정제 과정)

다당류 추출을 위한 다시마는 2019년 5월 완도 수협에서 구입하여 제염·수세·절단한 후, 2-3 cm 길이의 조각으로 잘게 썰고 65°C 에서 오븐-건조시켰다. 자세한 해조류 유래 다당류 (LJ polysaccharides, LJPS) 추출·정제 과정은 Figure 3 와 같다. 제조된 샘플을 비이커에 1: 30 (v: v, LJ 파우더: 증류수)의 비율로 혼합하고 4 hr 동안 끓인 후, 나일론 메시 (0.2 cm mesh)로 여과하고, 여과액의 1/4 부피로 농축시켰다. 냉각 후에 농축된 여과액과 trichloroacetic acid (TCA) 용액 (5% concentrate)을 1:2 (v: v, filter liquid: TCA)의 비율로 혼합하여 단백질을 제거과정을 거쳤다 (2 hr). 원심분리를 진행한 후 ($3,000\times\text{g}$, 10 min), 상층액을 4배 부피의 무수 에틸 알코올 (ethyl alcohol)을 혼합하여 4°C 에 12 hr 정치하여 crude

polysaccharides (PS)를 침전시켜 원심분리 하였다 (3,000×g, 10 min). 위 과정을 통해 획득한 crude PS는 증류수에 용해시켜 반투과성막 (3,500-MW cutoff, Beijing Solarbio Science and Technology Co. Ltd. Beijing, China)을 이용하여 12 hr 마다 한 번씩 증류수를 교체하며 투석을 진행하였다 (4 °C, 48 hr). 원심분리 (3,000×g, 10 min)를 진행하고, 상층액을 4배 부피의 무수 에틸 알코올을 혼합시켜 4 °C에 12 hr 정치하여 정치액을 원심분리 하였다. 마지막으로 획득한 침전물질은 동결건조를 통해 정제된 다당류 (pure PS)를 완성하였다 (Biosafer-10A, Biosofer, Nanjing, China). 최종 분말은 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco, Gaithersburg, MD, USA)에 용해시키고 여과하여 세포실험에 사용하였다.

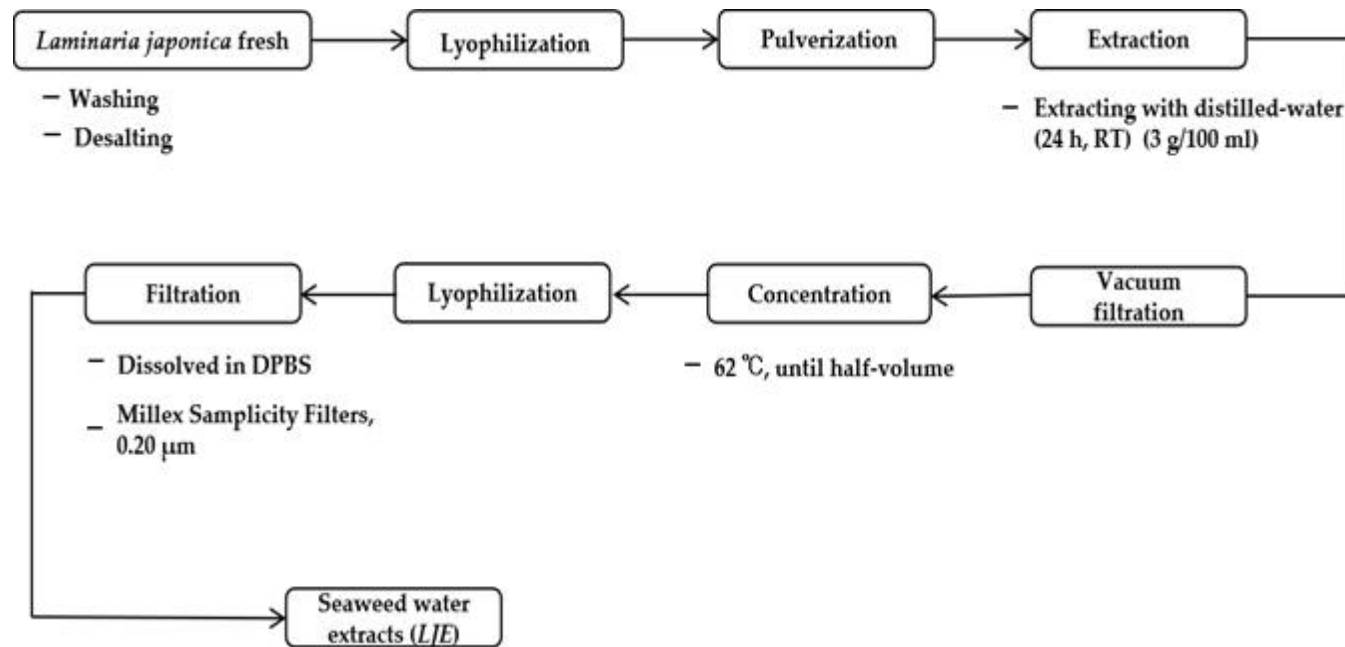


Figure 2. A flow diagram of LJ water extract preparation

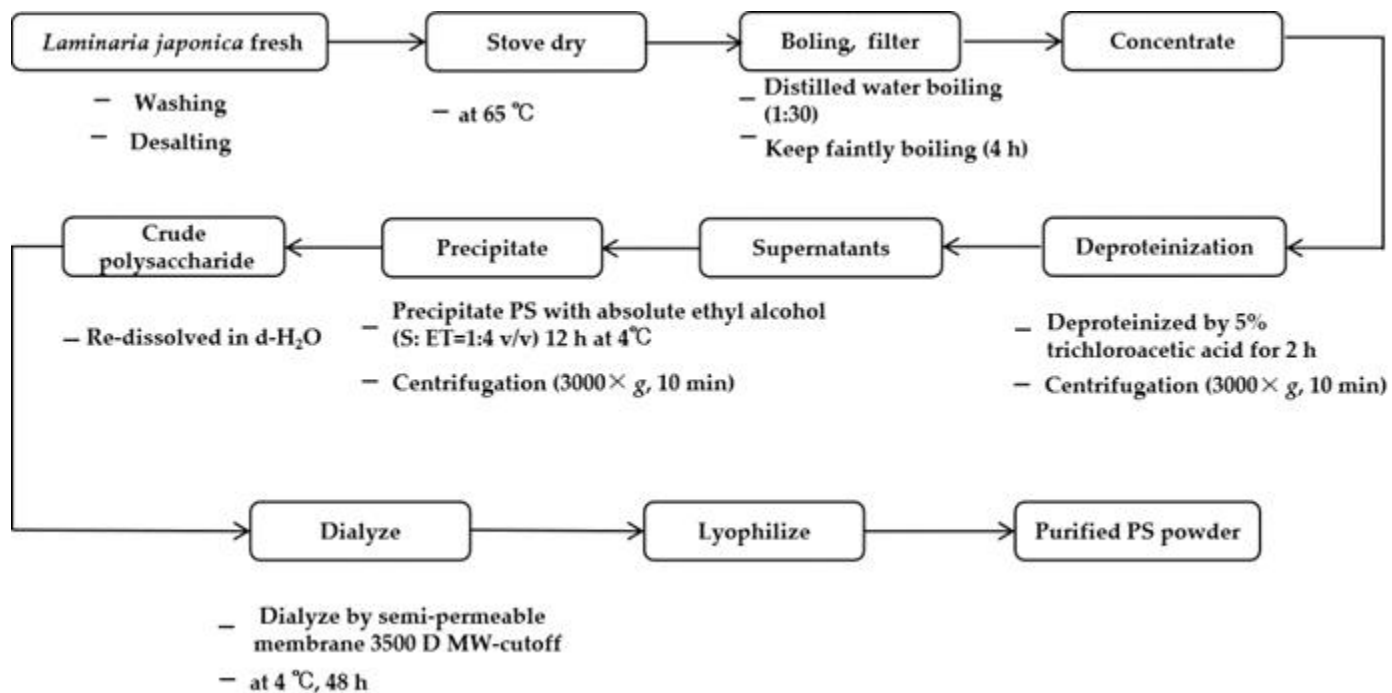


Figure 3. A flow diagram of Purified LJ polysaccharide preparation

2. 실험 방법

1) 다시마 추출물과 다시마 다당류의 이화학적 실험

(1) 총 폴리페놀 함량

LJE 및 LJPS 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법 [132]을 이용해서 측정했다. 해조류 물 추출물 혹은 해조류 유래 다당류 샘플 (8 mg/mL) 50 μ L와 1 M Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FMD Millipore Corporation, Darmstadt, Germany) 50 μ L를 96-well plate에 첨가해서 실온에서 6 min 을 반응시키고 2% Na_2CO_3 solution 100 μ L를 첨가해서 암실에서 30 min 더 반응시켰다. Gallic acid (Sigma, MO, USA)를 사용하여 표준곡선을 도출하였다. ELISA Microplate reader (Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 720 nm에서 측정했고 결과는 gallic acid concentration equivalents (GAE)에 의해서 계산하였다.

(2) 항산화능 측정

① ABTS 라디칼 소거능 분석

ABTS 라디칼 소거능 분석은 [133] 방법에 의해서 측정되었다. ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)은 3차 증류수를 이용해서 7.4 mM 농도로 만들고 동량의 2.6 mM potassium persulfate (1:1) 혼합하여 암실에 실온에서 12-24 hr 방치하고 ABTS stock solution로 사용하였다. 방치된 ABTS stock solution는 735 nm에서 흡광도가 1.40-1.50 이 되도록 3차 증류수로 희석했다. 해조류 시료 LJE, LJPS는 농도별 (8 mg/mL, 1.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.08 mg/mL) 25 μ L와 희석된 ABTS working solution 나 D₃ (background) 175 μ L 96-well plate에 첨가하고 실온에서 30 min 방치했다. 735 nm에서 Microplate

reader를 이용하여 흡광도를 측정하였고, Ascorbic acid (1000 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL)는 positive control로 사용했다. 다음 식을 이용해서 결과를 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ & = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}/A_{\text{control}})] \times 100 \end{aligned}$$

A_{sample} : optical density (OD) of sample (sample + ABTs solution)

$A_{\text{sample blank}}$: OD of sample only (without ABTs solution)

A_{control} : OD of control (ABTs solution without sample)

② DPPH 라디칼 소거능 분석

DPPH 라디칼 소거능 분석은 다음 방법을 이용하여 측정하였다. 해조류 시료 LJE, LJPS는 농도별 (8 mg/mL, 1.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.08 mg/mL) 25 µL와 0.2 mM DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)나 DMSO (background) 175 µL를 96-well plate에 첨가하고 실온에서 30 min 방치했다. Microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고 Ascorbic acid (1000 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL)는 positive control로 사용했다. 다음 식을 이용하여 소거능을 계산했다.

$$\begin{aligned} & \text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ & = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}/A_{\text{control}})] \times 100 \end{aligned}$$

A_{sample} : OD of sample (sample + DPPH solution)

$A_{\text{sample blank}}$: OD of sample only (without DPPH solution)

A_{control} : OD of control (DPPH solution without sample)

2) 세포 배양

대식세포, RAW 264.7 cell (TIB-71, BALB/c mice에서 유래, Abelson murine 백혈병 바이러스 유도하는 종양, 복수)는 America Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA.)에서 구매하였다. 세포의 배양은 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. 세포는 각 0.25 × 10⁶ cells/well 과 1.0 × 10⁶ cells/well의 농도로 6-well plate 및 24-well plate에서 1% FBS, 1% P/S 포함된 DMEM-high glucose 배지에서 배양했다. 본 실험에서 RAW세포는 passages 30 이하로 사용하였으며, 세포 배양에 사용된 모든 시약은 Gibco (BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 구매하여 사용하였다.

3) 세포 생존율 측정

Tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, or MTT)를 사용해서 세포의 생존율을 측정했다. RAW 264.7 세포는 24-well plates에서 배양하여, 해조류 시료 농도별로 (1, 5, 10, 25, 50 µg/mL) 처치했다 (37 °C 24 hr). 처치가 마무리 된 시점에서 40 µL의 MTT solution (5 mg/mL in PBS) 첨가해서 3-4 hr 추가 배양하였다. 그 후에 상층액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가해서 생성된 formazan이 충분히 용출될 수 있도록 shake 시켜줬다. 96-well plate에서 용출 된 액체 50 µL를 분주해서 Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정했다. 세포 생존율은 다음 식을 이용해서 계산했다.

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

4) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO 생성량 측정은 Griess Reagent system 방법을 이용해서 측정했다. 우선 RAW 264.7 cells 1×10^6 cells/well의 농도로 6-well plate에 16-18 hr 배양 후, 해조류 시료 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 2가지 농도를 첨가해서 6 hr를 배양 후에 LPS 100 ng/mL를 첨가해서 총 24 hr를 배양시켰다. 시료의 상층액 50 μL 와 동량의 Griess reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 96-well plate에서 실온에서 10-15 min 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 540 nm를 흡광도를 측정했다. Nitrite 생성량은 sodium nitrite를 이용해서 만든 표준 곡선 값을 이용하여 계산하였으며, LPS 처치군은 양성대조군으로 사용하였다.

5) RNA 분리·정제와 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용해서 RAW 264.7 cells에서 RNA를 추출하였으며, 모든 실험은 RNase-free 조건 하에서 이루어졌다. NanoDrop (Nano-200 Micro-Spectrophotometer, Hangzhou City, China) 기계를 이용해서 RNA 정량을 했다. mRNA 총 2 μg 를 kit (ABI High Capacity cDNA Archive kits, CA, USA)를 이용해서 20 μL 를 만들어서 25 °C 10 min, 37 °C 2 hr 또는 85 °C 5 min에서 cDNA로 합성했다. RNase Free Water로 cDNA를 5배를 희석했다. 2.5 μL cDNA, 5 μL SYBR (Bio-Rad®, CA, USA) 및 1.6 μm 의 forward 과 reverse primer를 섞고 최종 10 μL 양을 맞춰서 real-time qPCR (CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 PCR를 실시하였다. 이때 PCR 조건은 50 °C/2 min; 95 °C/2 min; 95 °C/15 s 및 60 °C/1 min 40회. 최종 extension는 65 °C/0.05 s에서 Roche Fast Start Universal SYBR Green Master를 사용해서 실시했다. RT-PCR에서 사용된 primer는 Table 3과 같다. mRPLP0 (36B4)는 internal control로 사용했다. Delta Ct 방법으로 유전자

발현을 계산했다. 본 실험에 사용하는 PCR primers는 Cosmo Genetech (Seoul, Korea)에서 구매했다.

Table 3. Primer sequences for RT-PCR

Target genes	Primer sequence (5'-3')	
mRPLP0 (36B4)	F:	GGATCTGCTGCATCTGCTTG
	R:	GGCGACCTGGAAGTCCAAC
mTNF- α	F:	GGCTGCCCCGACTACGT
	R:	ACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAAAT
mIL-6	F:	CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT
	R:	AGGGAAGGCCGTGGTTGT
mIL-1 β	F:	AAATACCTGTGGCCTTGGGC
	R:	CTTGGGATCCCACTCTCCAG
mMCP-1	F:	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG
	R:	GCTGCTGGTGATCCTCTTGT
mIL-10	F:	GCTCTTACTGACTGGGATGAG
	R:	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG

Abbreviations: RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; m, mouse; F, Forward primer; R, Reverse primer; mRPLP0 (36B4), internal control.

6) 염증관련 사이토카인 생성량 측정 (ELISA)

염증성 사이토카인 생성량은 ELISA assay를 사용하여 분석했다. RAW 264.7 cells는 1×10^6 cells/well의 농도로 6-well plate에 16-18 hr 배양했다. 그 이 후에 해조류 시료 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가해서 6 hr를 배양 후에 LPS를 첨가해서 총 24 hr를 배양시켰다. 시료의 상층액을 수거해서 ELISA kit

(TNF- α , IL-6, IL-10: BD PharMingen, San Jose, CA, USA)를 이용하여 protocol에 따라 실험을 진행했다. 96 well plate에서 Capture Antibody로 TNF- α , IL-6 및 IL-10 (Anti-mouse) 를 (Capture Antibody: Coating Buffer= 1: 250) 100 μ L 첨가하여 4 °C에서 overnight coating 시켰다. 다음날에 96 well plate는 wash buffer (1X)로 세척하고 Assay Diluent 200 μ L 1 hr blocking 시켰다. Wash buffer로 세척한 뒤, Standard 용액과 배양 상층액을 100 mL를 넣고 실온에서 2 hr를 반응시켰다. 반응 후 다시 세척한 뒤 Working Detector (Detection Antibody: Assay Diluent= 1: 500, Enzyme Reagent (Sav-HRP): diluted Detection Antibody= 1: 250) 100 μ L 첨가하여 실온에서 1 hr를 반응시켰다. TNF- α 의 경우, Detection Antibody (Detection Antibody: Assay Diluent= 1: 250)를 첨가하고 1 hr 반응 후, 세척하고 Enzyme Reagent (Enzyme Reagent: Detection Antibody= 1: 250)를 첨가하여 30 min을 반응시켰다. 그 후에는, 다시 세척하고, Substrate Solution(A: B= 1: 1) 100 μ L를 첨가하여 실온에서 30 min 동안 암실에서 반응시켰다. Stop Solution로 반응을 종료시킨 후, 30 min 안에 Microplate reader를 이용하여 450 nm 및 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양 상층액은 centrifuge 14,000 rcf, 4 °C, 5 min 시키고 위의 액체를 가져 Assay Diluent로 희석했다 (TNF- α : 500배; IL-6: 50배 희석; IL-10: 2배 희석). Standard로 만든 표준곡선을 통해 TNF- α , IL-6 및 IL-10 생성량을 계산하였다.

3. 통계 분석

모든 데이터는 one-way analysis of variance (ANOVA)을 통해 분석했다. GraphPad Software, Prism 8.0.1 (San Diego, CA, USA)를 이용해서 analysis of variance (ANOVA) one-way multiple comparison (Dunnett's or Tukey's multiple comparisons) 또는 t-test ($P < 0.05$)를 실시하였다. 모든 값은 평균 (mean) \pm SEM으로 나타냈다.

IV. 연구 결과

1. 다시마 물 추출물 및 다시마 유래 다당류의 이화학적 실험 결과

다시마 물 추출물 및 다시마 유래 다당류에 따른 이화학적 성분의 변화를 관찰하기 위하여 총 폴리페놀 함량, 항산화 효과를 확인하였다.

1) 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 총 폴리페놀 함량

본 연구에서 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류 추출물의 총 폴리페놀 수치의 결과는 Table 4와 같다. 위 실험방법에서 기술된 바와 같이 Gallic acid concentration equivalents (GAE) 기준으로 시료의 폴리페놀 수치를 계산하였다. LJE의 총 폴리페놀 수치는 2.163 μg GAE/mg, LJPS의 총 폴리페놀 수치는 0 μg GAE/mg 나타났다. LJE는 LJPS보다 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 높았으며, 다당류의 정제과정에서 폴리페놀이 손실됨을 확인하였다.

Table 4. Total polyphenol contents of LJE and LJPS

Samples	Total polyphenol contents ($\mu\text{g GAE/mg}$)
LJE	2.163 ± 0.105
LJPS	0

Asterisks (*) indicate significant differences of $p < 0.05$.

The concentration of samples was 2 mg/mL.

The data are presented as the mean \pm SEM, $n = 2$, two independent experiments.

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

2) 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 항산화 효과

① ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능 결과는 Figure 4와 같다. LJE 및 LJPS의 ABTS 라디칼 소거능은 양성 대조군 (Ascorbic acid, AA)과 비교하여 낮았고 농도별로 ABTS 라디칼 소거능 증가하는 결과가 나타났다. LJE, LJPS 1 mg/mL의 농도에서 ABTS 라디칼 소거능 결과는 각 50.5%, 21.5%로 나타났다. ABTS 라디칼 소거능은 LJPS보다 LJE에서 더 높게 나타났다. 200 μ g/mL부터 LJE, LJPS가 유의적으로 차이가 나타났다.

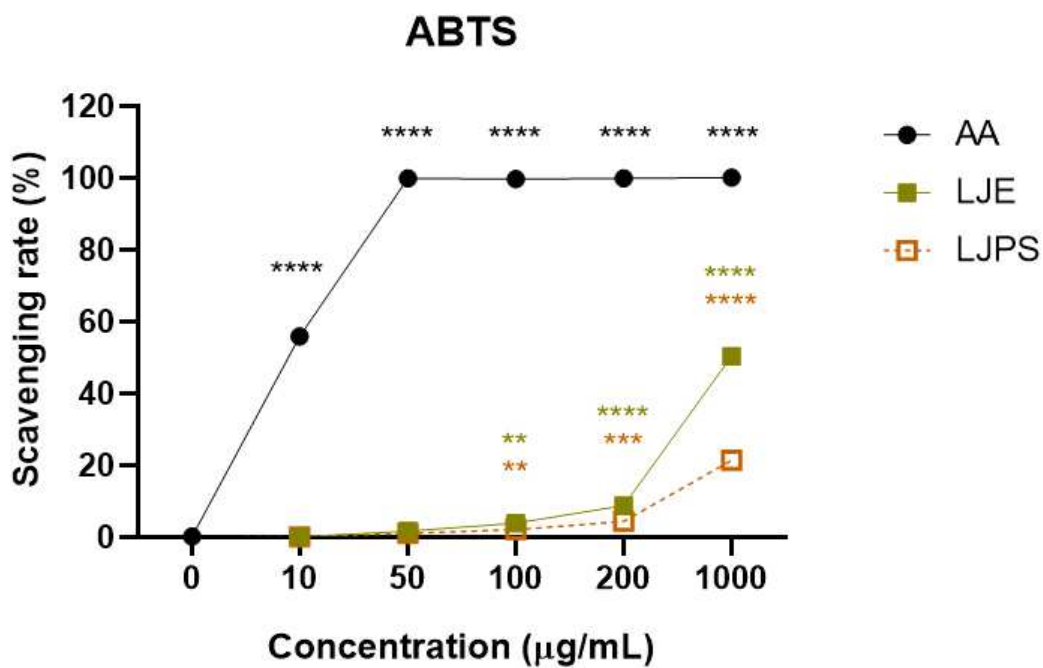


Figure 4. ABTS radical scavenging activity of LJE and LJPS

The data are presented as the mean \pm SD, n = 2, two independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides; AA, Ascorbic acid.

② DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능 결과는 Figure 5와 같다. LJE 및 LJPS의 DPPH 라디칼 소거능은 양성 대조군 (Ascorbic acid)과 비교하여 낮았고 농도별로 DPPH 라디칼 수거능 증가하는 결과가 나타났다. 1 mg/mL 농도까지 LJE 및 LJPS가 DPPH 라디칼 소거능이 없음을 확인하였다.

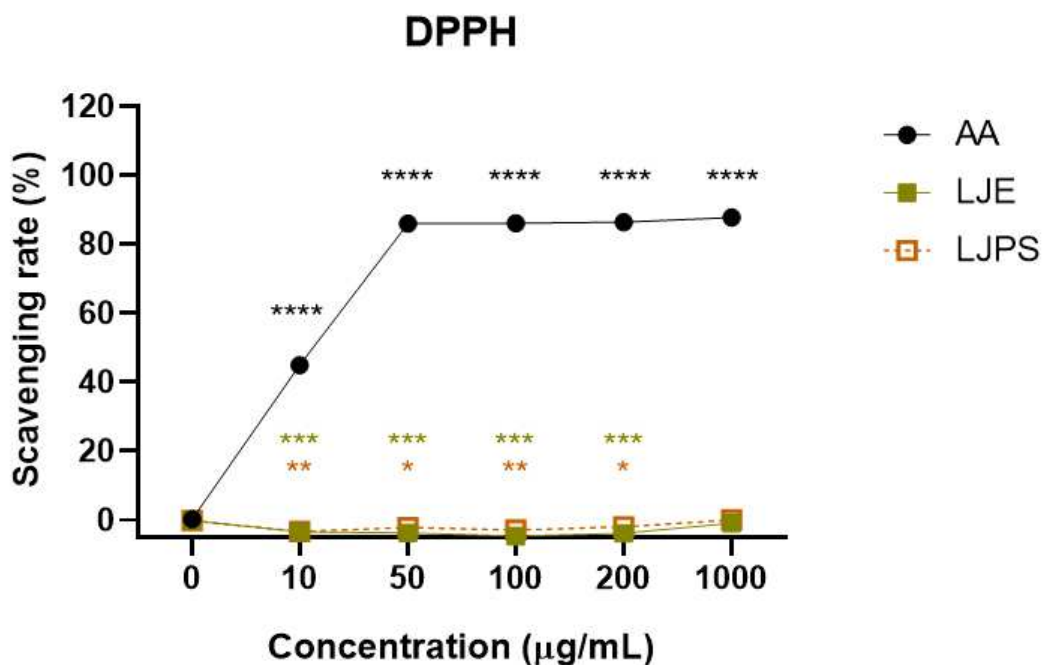


Figure 5. DPPH radical scavenging activity of LJE and LJPS

The data are presented as the mean \pm SD, n = 2, two independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides; AA, Ascorbic acid.

2. 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 세포독성

다시마 시료 2종 (LJE, LJPS)가 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였다. RAW 264.7에 해조류 추출물을 농도별 (1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 해조류 추출물의 잠재적인 세포 독성을 확인 한 결과는 Figure 6와 같다.

대조군에 비하여 LJE는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서는 세포 생존율의 유의적인 감소를 관찰하였다. LJPS의 경우에는 모든 처리 농도에서 대조군과 비교하여 유의적으로 차이가 없었다. 그러나 LJPS 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 때 세포 생존율은 각각 13%, 19%가 감소되었다. 따라서 본 실험결과에 따라 추후 모든 RAW 264.7 세포를 이용한 다시마 시료농도는 LJE와 LJPS 모두에서 1과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 결정하여 진행하였다.

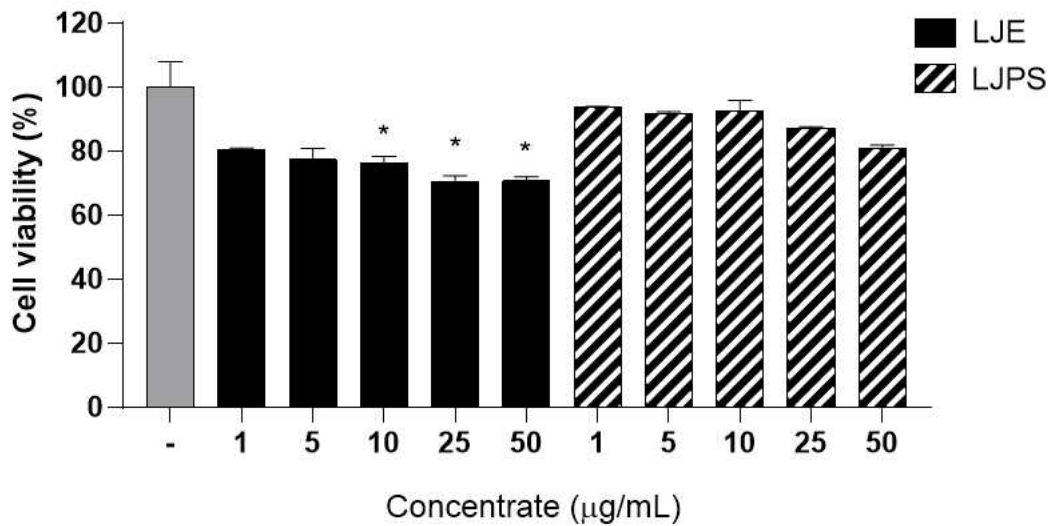


Figure 6. Cellular toxicity of LJE and LJPS in RAW 264.7 cells

Cytotoxicity of LJE or LJPS on RAW 264.7 cells determined via an MTT assay.

The data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3$, three independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Asterisks (*) indicate significant differences of $p < 0.05$.

Column of grey, control without samples; Column of black, LJE; Column of pattern, LJPS.

Abbreviations: MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

3. 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류가 NO 생성에 미치는 영향

LJE와 LJPS의 항염증 효과를 평가하기 위해서 LPS로 자극을 유도한 RAW 264.7 세포에서 해조류 추출물의 NO 생성량 억제효과를 측정했다. LJE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군에서 대조군 보다 유의적으로 높은 NO 생성량을 보였고, LJE (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군은 LPS로 유도된 NO 생성량을 유의적으로 감소시켰다 (Figure 7. Panel a.). 비슷한 패턴이 LJPS에서도 관찰되었으며, LJPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치만으로 대조군보다 유의적으로 높은 NO를 생산하였고, 1과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LJPS의 처치는 LPS로 유도된 NO 생성량을 유의적으로 감소시켰다 (Figure 7. Panel b.).

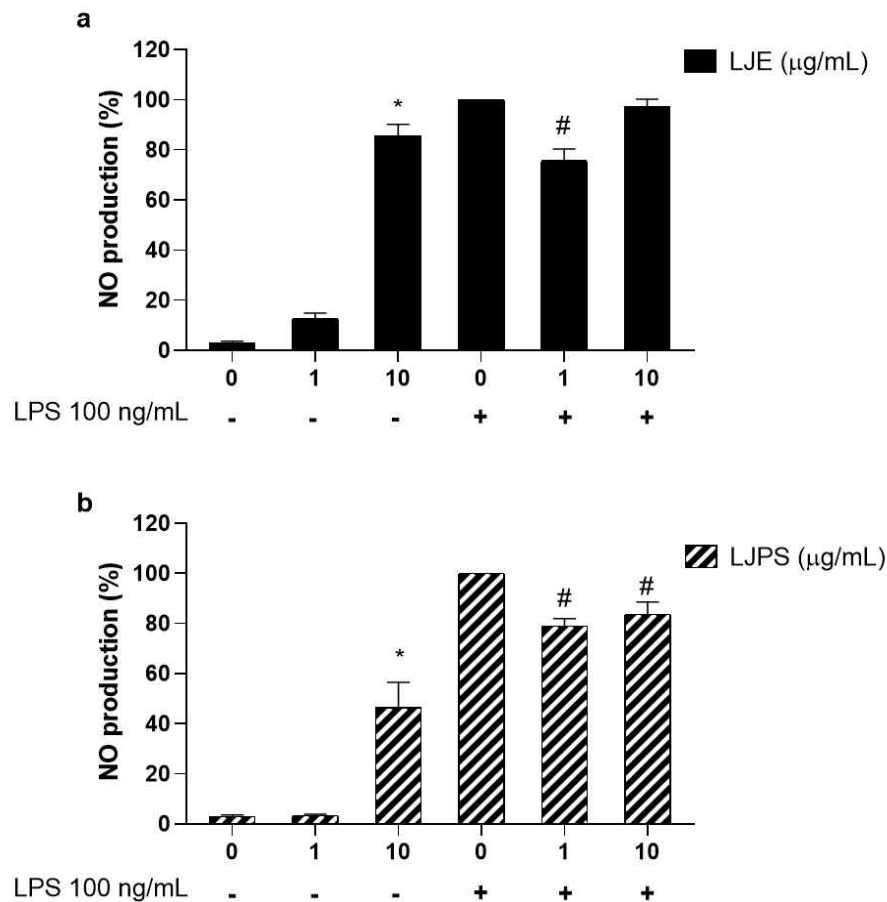


Figure 7. Effect of LJE and LJPS on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells

Panel a. Nitric oxide (NO) production treated with LJE 1, 10 µg/mL with/without LPS in RAW 264.7 cells. **Panel b.** NO production treated with LJPS 1, 10 µg/mL with/without LPS in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of LJE or LJPS for 6 hrs, then incubated with LPS (100 ng/ml) for another 18 hrs. The data are presented as the mean ± SEM, n = 3, three independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Asterisks (*) indicate significant differences from control, and hashtag (#) indicate significant differences from LPS ($p < 0.05$).

Column of black, LJE; Column of pattern, LJPS.

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

4. 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 항염증 관련 유전자 발현에 미치는 영향

Figure 8-12에서 보여진 바와 같이 LJE와 LJPS의 염증조절 능력의 기전을 알아보기 위해서, 다양한 염증관련 사이토카인, TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1 및 IL-10의 mRNA 발현을 확인하였다. TNF- α mRNA의 경우 LJE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군에서 대조군 보다 유의적으로 높은 TNF- α 생성량을 보였고, LJE, LJPS (1과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처치한 군에서는 LPS자극에 의해 TNF- α 생성량은 유의적 차이가 없었다 (Figure 8). IL-6 mRNA의 경우, LJE, LJPS (1과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 모든 군에서 대조군과 유의적 차이가 없었고 LPS자극에 의한 IL-6 생성량도 유의적 차이가 없었다 (Figure 9). IL-1 β mRNA의 경우, LJE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군은 LPS군의 IL-1 β 생성량과 비교하여 유의적으로 감소시켰다. LJPS (1과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군에서 LPS자극에 의해 IL-1 β 생성량을 유의적 차이가 없었다 (Figure 10). 비슷한 패턴이 MCP-1 mRNA에서도 LJE, LJPS (1과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 모든 군에서 대조군과 유의적 차이가 없었고 LPS자극에 의해 MCP-1 생성량도 유의적 차이가 없었다 (Figure 11). IL-10 mRNA의 경우에는 LPS군과 비교하여 LJE와 LJPS의 두가지 농도에서 IL-10의 생성량을 유의적으로 감소되었다 (Figure 12).

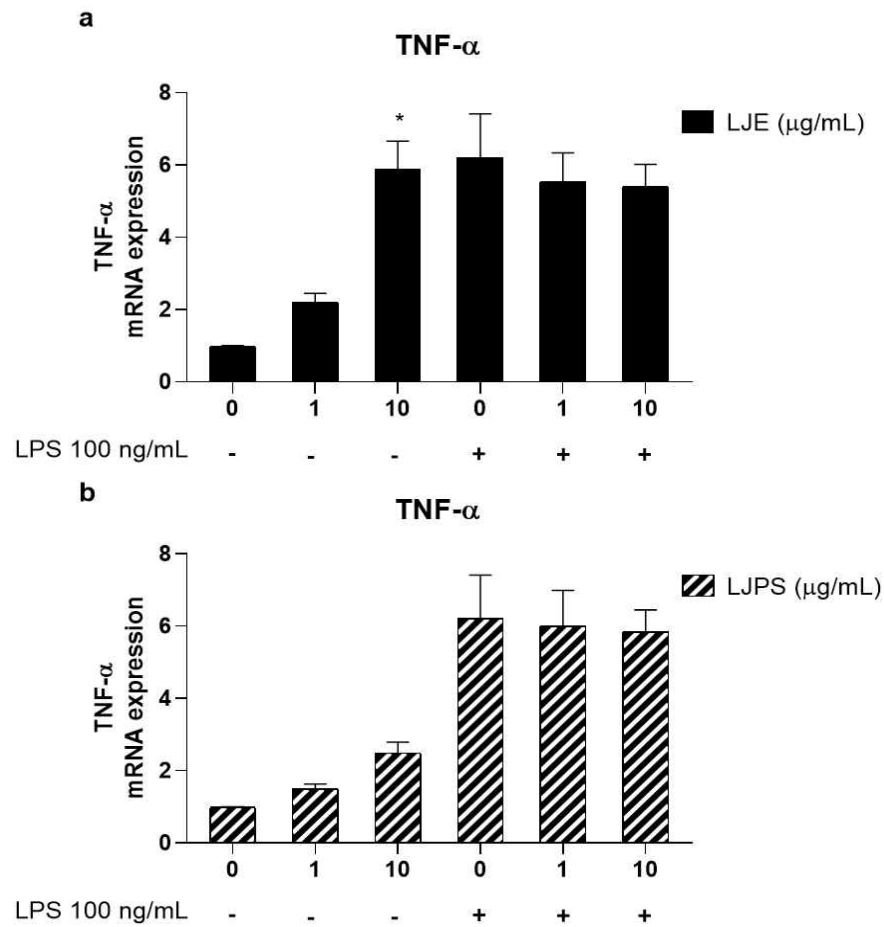


Figure 8. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced TNF- α expression in RAW 264.7 cells

Panel a. Effect of LJE on LPS-induced TNF- α expression in RAW 264.7 cells. **Panel b.** Effect of LJPS on LPS-induced TNF- α expression in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of LJE or LJPS for 6 hrs, then incubated with LPS (100 ng/ml) for another 18 hrs. The data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3$, three independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Asterisks (*) indicate significant differences from control ($p < 0.05$).

Column of black, LJE; Column of pattern, LJPS.

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

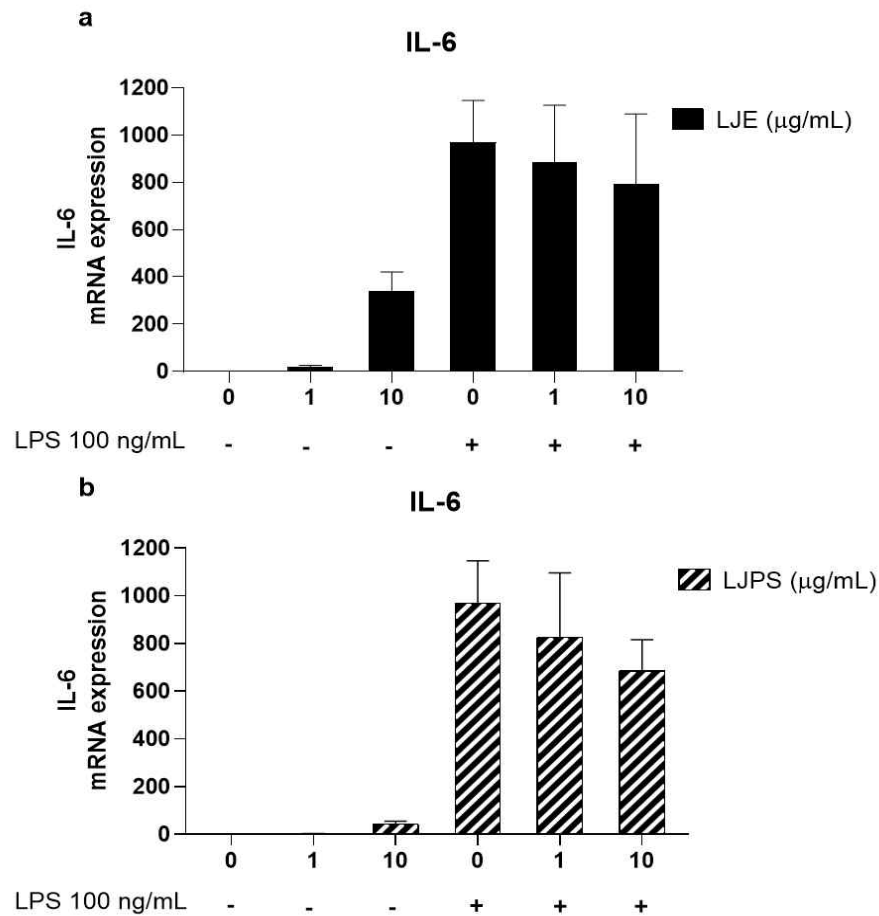


Figure 9. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced IL-6 expression in RAW 264.7 cells

Panel a. Effect of LJE on LPS-induced IL-6 expression in RAW 264.7 cells. **Panel b.** Effect of LJPS on LPS-induced IL-6 expression in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of LJE or LJPS for 6 hrs, then incubated with LPS (100 ng/ml) for another 18 hrs. The data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3$, three independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Column of black, LJE; Column of pattern, LJPS.

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

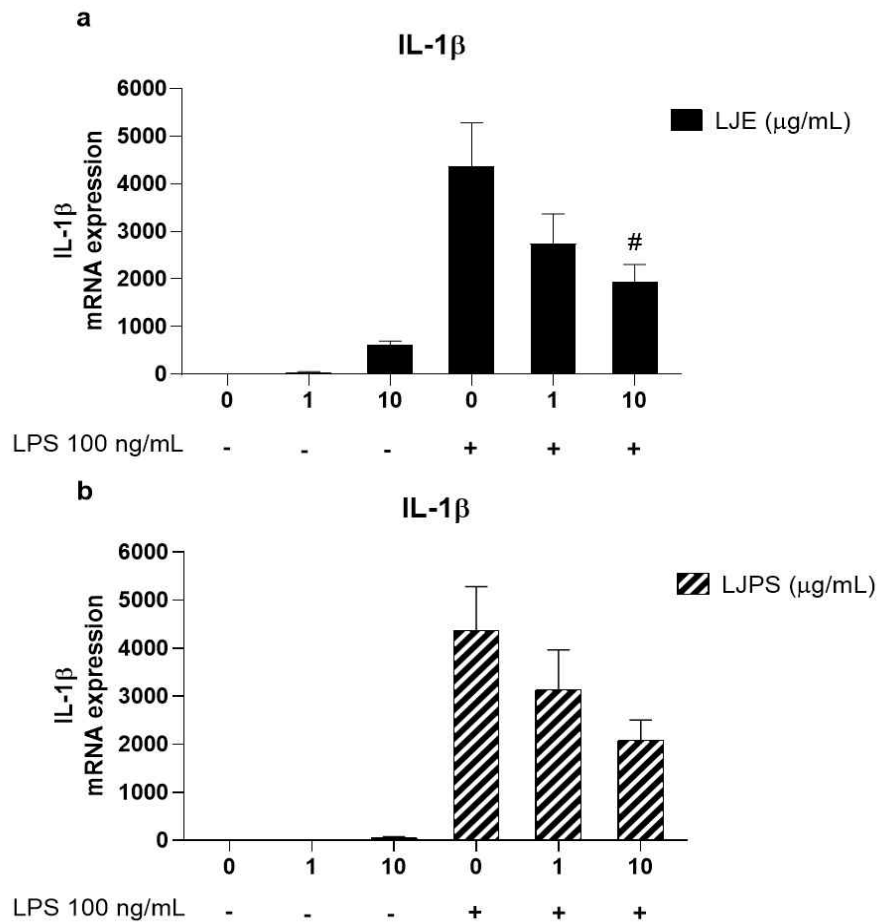


Figure 10. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced IL-1 β expression in RAW 264.7 cells

Panel a. Effect of LJE on LPS-induced IL-1 β expression in RAW 264.7 cells. **Panel b.** Effect of LJPS on LPS-induced IL-1 β expression in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of LJE or LJPS for 6 hrs, then incubated with LPS (100 ng/ml) for another 18 hrs. The data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3$, three independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Hashtag (#) indicate significant differences from LPS ($p < 0.05$).

Column of black, LJE; Column of pattern, LJPS.

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

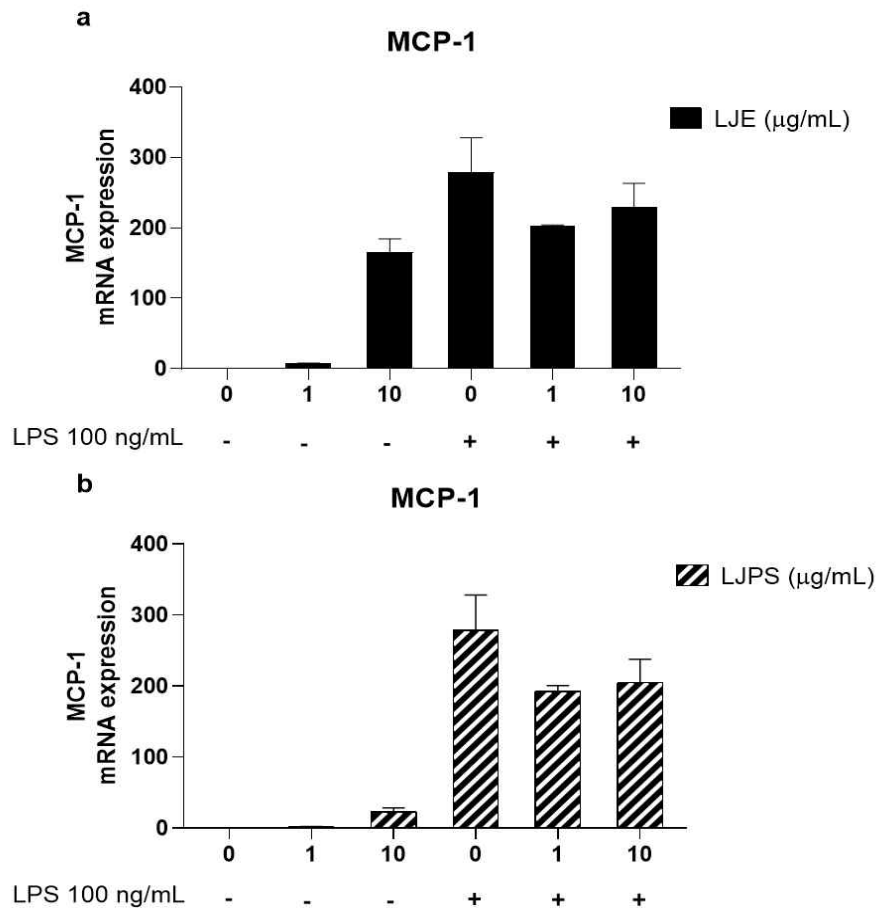


Figure 11. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced MCP-1 expression in RAW 264.7 cells

Panel a. Effect of LJE on LPS-induced MCP-1 expression in RAW 264.7 cells. **Panel b.** Effect of LJPS on LPS-induced MCP-1 expression in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of LJE or LJPS for 6 hrs, then incubated with LPS (100 ng/ml) for another 18 hrs. The data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3$, three independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Column of black, LJE; Column of pattern, LJPS.

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

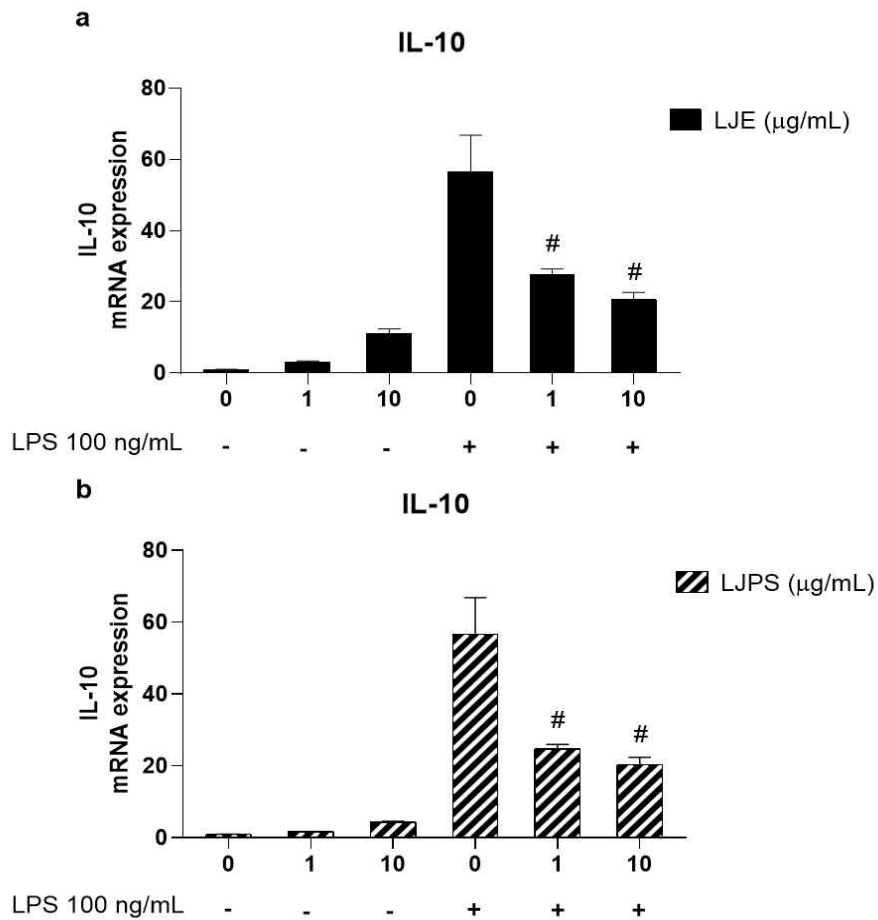


Figure 12. Effect of LJE and LJPS on LPS-induced IL-10 expression in RAW 264.7 cells

Panel a. Effect of LJE on LPS-induced IL-10 expression in RAW 264.7 cells. **Panel b.** Effect of LJPS on LPS-induced IL-10 expression in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of LJE or LJPS for 6 hrs, then incubated with LPS (100 ng/ml) for another 18 hrs. The data are presented as the mean \pm SEM, $n = 3$, three independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Hashtag (#) indicate significant differences from LPS ($p < 0.05$).

Column of black, LJE; Column of pattern, LJPS.

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

5. 다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류가 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

해조류 추출물 LJE와 LJPS를 각각 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하여 대식세포에서 LPS로 유도되는 TNF- α , IL-6 및 IL-10의 생성량에 미치는 영향을 확인했다 (Figure 13). LPS 자극에 의해 증가한 TNF- α 및 IL-6의 생성량은 LJE 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LJPS 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 군에서 TNF- α 및 IL-6의 생성량을 유의적으로 감소시켰다. 즉, LJE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 처리군에서는 LPS의 자극으로 생성된 TNF- α 및 IL-6을 감소시켰고, IL-10의 경우에는 LPS군의 IL-10 생성량과 비교하여 LJE와 LJPS의 두가지 농도에서 IL-10의 생성량을 유의적으로 감소시켰다.

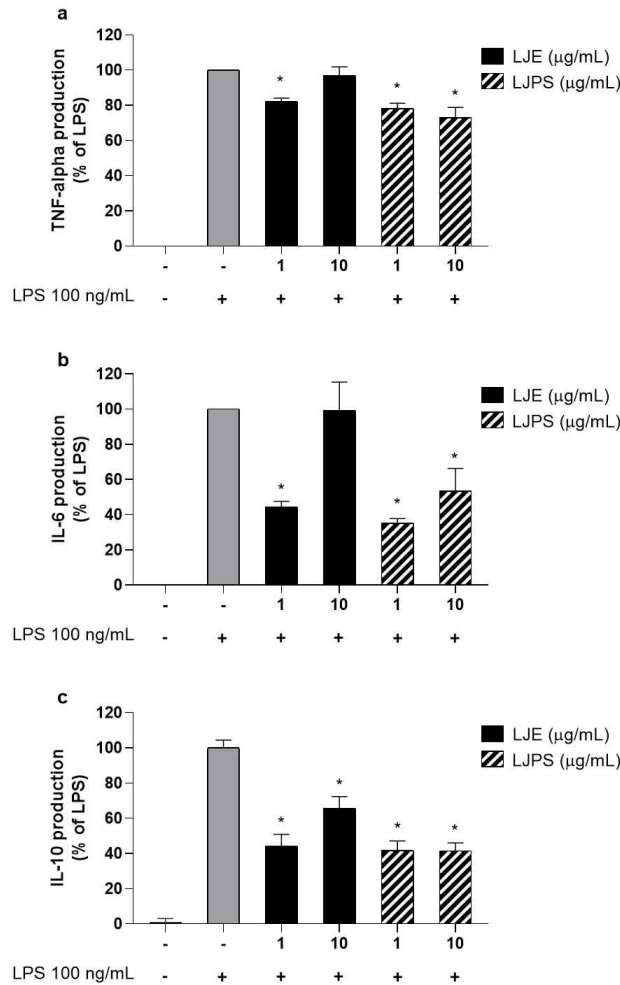


Figure 13. Effect of LJE and LJPS on inflammatory cytokine production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

Panel a. Effect of LJE and LJPS (1, 10 µg/mL) on LPS-induced TNF-α expression in RAW 264.7 cells. **Panel b.** Effect of LJE and LJPS (1, 10 µg/mL) on LPS-induced IL-6 expression in RAW 264.7 cells. **Panel c.** Effect of LJE and LJPS (1, 10 µg/mL) on LPS-induced IL-10 expression in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of LJE or LJPS for 6 hrs, then incubated with LPS (100 ng/ml) for another 18 hrs. The data are presented as the mean ± SEM, n = 3, two independent experiments.

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Asterisks (*) indicate significant differences of $p < 0.05$.

Abbreviations: LJE, *Laminaria japonica* extract; LJPS, *Laminaria japonica* polysaccharides.

V. 고찰

본 연구에서는 해조류 다시마 물 추출물, 다시마 유래 다당류를 추출해서 이화학적 특성을 비교하고 이들의 면역조절 효과를 대식세포 RAW 24.7 세포를 이용해서 규명하고자 하였다.

LJE 및 LJPS의 이화학적 특성 분석 결과, 총 폴리페놀 함량은 LJE는 2.163 μg GAE/mg로 나타났으나, LJPS에서는 폴리페놀이 검출되지 않았다. 이는 다시마에서 다당류를 분리·정제하는 과정에서 가열 및 여과 등을 거쳐 폴리페놀이 손실되는 것으로 사료된다. Min Joo Bae 외 (2015)는 에탄올 다시마 추출물은 4 mg GAE/100 g로 보여줬으며 이는 본 연구와 비슷한 결과를 보였다 [134]. 신선한 다시마를 건조시킬 때 LJE는 동결건조로 진행했고 LJPS는 열풍건조로 진행했다. 백수현 외 (2019)는 다시마가 70 $^{\circ}\text{C}$, 5 hr에서 열풍 건조 후 총 페놀함량은 50%까지 줄어든 것을 확인하였으며 이는 다시 본 연구의 총 폴리페놀 함량 결과를 입증할 수 있다 [135]. 다시마 추출 방법과 조건에 따라 함유되어 있는 총 폴리페놀 함량이 다를 수 있다. 권유리 외 (2017)도 추출방법에 따라 해조류 추출물의 생리활성이 다를 수 있음을 보여주었다 [136].

본 연구에서 시료의 농도는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 mg/mL까지 사용했고 항산화 능력을 측정했다. LJE, LJPS 1 mg/mL의 농도에서 ABTS 라디칼 소거능 결과는 각 50.5%, 21.5%로 LJE가 LJPS보다 더 높은 결과가 나타났다. LJE, LJPS 1 mg/mL의 농도까지 DPPH 라디칼 소거능이 없음을 확인하였다. Wan Peng 외 (2015)는 다시마를 이용해서 3가지 방법으로 다당류를 추출했고 3종류 다시마 유래 다당류 (1 mg/mL) 처치군에서 ABTS 라디칼 소거능이 20% 정도 나타났고 DPPH 라디칼 소거능이 5% 이하로 나타났다 [137]. 이는 본 연구와 동일한 결과를 나타냈다. 또한, 본 연구에서 ABTS, DPPH radical 소거능 두

가지 방법으로 측정하였고 항산화 효능이 일치하지 않았다. 이것은 각 라디칼 소거능 성분이 다르기 때문이다. Paraskevi Kouka 외 (2017), Raj Kumar Salar 외 (2011) 연구에서도 측정방법에 따라 항산화 효능의 경향이 다른 결과가 나타났다 [138, 139].

대조군에 비하여 LJE는 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 세포 생존율의 유의적인 감소를 관찰하였고 RAW 264.7 세포에서 독성이 있는 것을 확인했다. LJPS의 경우에는 모든 처치 농도에서 독성이 나타나지 않음을 확인했다. 그러나 LJPS 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처치했을 때 세포 생존율은 13%, 19% 감소하여 LJPS의 처치농도는 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 선정했다. LJE와 LJPS를 비교하기 위해 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 독성이 나타나도 참고적으로 같이 사용했다.

Preliminary data로써 LPS를 농도별 (10 ng/mL, 100 ng/mL, 1000 ng/mL), 시간별 (0 h, 6 h, 18 h, 24 h)로 RAW 264.7 세포에 처치해서 NO assay, MTT assay 및 염증성 사이토카인 (TNF- α) 생성량을 확인했고 이 preliminary data 결과에 의해서 본 연구에서는 LPS의 농도를 100 ng/mL로 선정했다 (data not shown).

LJPS를 10 $\mu\text{g/mL}$ 처치할 때 NO의 생성량을 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 김동섭 외 (2018)의 연구에서는 해조류 모자반 추출물은 RAW 264.7 대식세포에서 면역활성화 효과가 보였고 Sang Chul Jeong 외 (2015)의 연구에서는 갈조류인 톳 유래 다당류는 RAW 264.7 세포에서 면역활성화 효과도 보였다 [140, 141]. 반면에 LJE 1 $\mu\text{g/mL}$, LJPS 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 는 LPS를 처치한 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과가 보였다. 따라서 LJE가 RAW 264.7 cell에서 항염증 효과를 가지는 것을 알 수 있으며 LJPS가 RAW 264.7 cell에서 양면적 염증 조절 효과 (biphasic immunomodulatory effect)를 가지는 것을 알 수 있다.

LJE, LJPS가 LPS 자극으로 인해 증가한 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-6,

IL-1 β , MCP-1)의 발현은 유의적이지 않았다. LJE, LJPS 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 모든 군에서 LPS 자극으로 인해 증가한 항염증성 사이토카인 (IL-10)의 발현이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다. 본 연구에서 염증관련 mRNA 발현 측정 결과는 다른 연구결과와는 다르게 나타났다. 예를 들면, Jing Ye 외 (2020) 연구에서 다시마 유래 fucoidan는 LPS 자극으로 인해 증가한 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 발현이 유의적으로 감소시켰다 [142].

ELISA 분석 결과에서는 LJE (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LJPS (1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군은 LPS 유도되는 RAW 264.7 세포에서 TNF- α , IL-6, IL-10의 생성량을 유의적으로 감소되었다. LJE (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LJPS (1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군은 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과가 보였다. Park 외 (2013) LJE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)가 LPS를 처치한 RAW 264.7 세포에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량을 감소시켰으며 본 연구와 동일한 결과를 나타냈다 [143].

본 연구결과에서 LJE와 LJPS는 LPS의 자극으로 증가된 염증관련 사이토카인 mRNA 발현에 유의적인 영향을 주지 않았지만 ELISA 실험결과에서 LJE와 LJPS는 LPS의 자극으로 증가된 염증관련 사이토카인의 생성량 (단백질 발현)을 유의적으로 감소시켰다. ELISA는 세포 상층액을 이용해서 항체에 결합된 효소를 통해 항원-항체 반응을 확인하는 방법으로 세포에서 분비한 단백질을 측정할 수 있다. RT-PCR는 mRNA의 생성량을 측정하는 방법이다. 세포 안에 인자발현 기전이 복잡하고 다양한 염증 신호 전달 체계 (경로)가 존재한다. LPS가 유도한 RAW 264.7 세포 모델에서 두 실험은 측정하는 인자발현의 위치가 다르기 때문에 LJE와 LJPS가 단백질에서 저해효과가 보였고 mRNA에서 명확한 저해효과가 나타나지 않았다. 따라서 LJE 및 LJPS가 전사 과정 (transcriptional level)에서 조절하는지, 번역 과정 (translational level)에서 조절하는지 확인하려면 추가 연구가 필요하다.

VI. 요약 및 결론

본 연구에서는 갈조류인 다시마 (*Laminaria japonica*)를 이용하여 다시마 물 추출물 (LJE) 및 다시마 유래 다당류 (LJPS)를 추출해서 대식세포 RAW 264.7 세포를 이용해서 LJE 및 LJPS의 이화학 특성 (총 폴리페놀 함량, ABTS, DPPH 라디칼 소거능 측정) 의 고찰과 항염증에 초점을 둔 생리활성 효과를 비교하고 그 기전에 대해 연구해 보고자 하였다. 그 결과를 다음과 같이 요약하였다.

1. LJE의 총 폴리페놀 함량은 2.163 μg GAE/mg이지만, LJPS에서는 측정되지 않았다. 다시마에서 다당류를 추출 정제하는 과정에서 폴리페놀이 손실됨을 확인하였다.

2. 세포에 독성을 유발하지 않는 농도에서는 LJE의 항산화 효과가 AA (Ascorbic acid)과 비교해서 탁월하지는 않았다. 따라서 LJE와 LJPS의 항산화능 결과에서 알 수 있듯이 항산화능이 다시마 유래 다당류의 주된 생리활성은 아님을 확인했다.

3. 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 LJE, LJPS가 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처치한 결과, LJE 가 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 처리군에 세포 독성을 나타냈고 LJPS가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 처리한 군에서 세포 독성을 나타나지 않았다. LJE가 LJPS보다 대식세포에서 상대적으로 높은 세포 독성을 보였다.

4. LJE 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처치군이 LPS 자극으로 인해 증가된 NO 생성량을 유의적으로 감소시키는 항염증 효과를 관찰하였다. 또한 LJPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군이 대조군보다 NO 생성량을 유의적으로 증가했고 LJPS (1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)가 LPS로 염증을 유도된 NO 생성량을 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. 즉, LJPS 는 RAW 264.7 cell에서 양면적 염증조절 효과 (biphasic immunomodulator

y) 를 기대해 볼 수 있다.

5. LJE와 LJPS가 LPS 자극으로 인해 증가한 TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1의 mRNA 발현에 미치는 효과는 유의적이지 않았다. 단, 유전자 발현을 확인한 염증성 사이토카인 중 LJE와 LJPS (1, 10 μ g/mL)는 LPS 자극으로 인해 증가한 IL-10의 mRNA 발현이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다.

6. LPS로 염증 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 염증 관련 사이토카인 TNF- α , IL-6 및 IL-10의 단백질 생성량을 측정된 결과, LJE 1 μ g/mL, LJPS 1, 10 μ g/mL가 LPS의 자극으로 인해 증가한 TNF- α , IL-6 및 IL-10의 생성량을 유의적으로 감소시켰다.

이상의 결과를 종합하여 보면 다시마에서 다당류를 추출 정제하는 과정을 통해 폴리페놀이 손실되며, LJE와 LJPS 항산화능 결과에서 알 수 있듯이 항산화능이 다시마 유래 다당류의 주된 생리활성은 아님을 확인했다. LJE가 LJPS보다 대식세포에서 상대적으로 높은 세포 독성을 보였으며, LJPS와 LJE의 염증조절 기전에 차이를 보이는 것을 알 수 있다. LJE는 RAW 264.7 대식세포에 독성이 없는 농도에서 항염증 효과를 보이지만, LJPS는 특정 농도에 따라 RAW 264.7 세포에서 면역자극 작용과 항염증 효과를 담당하는 LJPS의 양면적인 면역조절 효과 (biphasic immunomodulatory effect)를 확인하였다. 본 연구를 통해 LJE와 LJPS의 면역제 조절제의 역할을 수행하는 기능성 천연 소재로의 가능성을 제시하였다.

VII. 참고 문헌

1. Coussens, L.M. and Z. Werb, Inflammation and cancer. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 860–867.
2. Hu, H., et al., AGEs and chronic subclinical inflammation in diabetes: disorders of immune system. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2015. **31**(2): p. 127–137.
3. Sorci-Thomas, M.G. and M.J. Thomas, Microdomains, inflammation, and atherosclerosis. *Circulation research*, 2016. **118**(4): p. 679–691.
4. Vane, J. and R. Botting, New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflammation research*, 1995. **44**(1): p. 1–10.
5. Silverstein, F.E., et al., Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. *Jama*, 2000. **284**(10): p. 1247–1255.
6. Chi, T.-Y., H.-M. Zhu, and M. Zhang, Risk factors associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced gastrointestinal bleeding resulting on people over 60 years old in Beijing. *Medicine*, 2018. **97**(18).
7. Gabriel, S.E., L. Jaakkimainen, and C. Bombardier, Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *Annals of internal medicine*, 1991. **115**(10): p. 787–796.
8. Trelle, S., et al., Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *Bmj*, 2011. **342**: p. c7086.
9. Langham, M., J. Well, and P. Wainwright, Risk of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroid anti-inflammatory drugs. *Lancet*, 1994. **343**: p. 1075–1078.
10. Lim, S., et al., How to balance cardiorenometabolic benefits and risks of statins. *Atherosclerosis*, 2014. **235**(2): p. 644–648.
11. McLachlan, J., Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization, in *Biosalinity in Action: Bioproduction with Saline Water*. 1985, Springer. p. 137–157.
12. Kadam, S.U., B.K. Tiwari, and C.P. O'Donnell, Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of agricultural and food*

- chemistry, 2013. **61**(20): p. 4667–4675.
13. Plaza, M., A. Cifuentes, and E. Ibáñez, In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 2008. **19**(1): p. 31–39.
 14. Pereira, L., A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. *Seaweed: Ecology, nutrient composition and medicinal uses*, 2011: p. 15–47.
 15. Holdt, S.L. and S. Kraan, Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*, 2011. **23**(3): p. 543–597.
 16. Wijesinghe, W. and Y.-J. Jeon, Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 2012. **88**(1): p. 13–20.
 17. Chojnacka, K., et al. Biologically active compounds in seaweed extracts—the prospects for the application. in *The open conference proceedings journal*. 2012.
 18. Marinho–Soriano, E., et al., Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource technology*, 2006. **97**(18): p. 2402–2406.
 19. Rico, D., et al., Characterization and *in vitro* evaluation of seaweed species as potential functional ingredients to ameliorate metabolic syndrome. *Journal of Functional Foods*, 2018. **46**: p. 185–194.
 20. Gupta, S. and N. Abu–Ghannam, Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 2011. **22**(6): p. 315–326.
 21. Jang, W.S. and S.Y. Choung, Antiobesity effects of the ethanol extract of *Laminaria japonica* Areshoung in high–fat–diet–induced obese rat. *Evidence–Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. **2013**.
 22. Zhu, Q., et al., Antitumor activity of polysaccharide from *Laminaria japonica* on mice bearing H22 liver cancer. *International journal of biological macromolecules*, 2016. **92**: p. 156–158.
 23. Kang, S.–y., et al., Anti–diabetic effects and anti–inflammatory effects of *Laminaria japonica* and *Hizikia fusiforme* in skeletal muscle: *in vitro* and *in vivo* model. *Nutrients*, 2018. **10**(4): p. 491.
 24. Peng, F.–H., et al., Purification, structure features and anti–atherosclerosis activity

- of a *Laminaria japonica* polysaccharide. International journal of biological macromolecules, 2015. **81**: p. 926–935.
25. Fang, Q., et al., Immunomodulatory activity on macrophage of a purified polysaccharide extracted from *Laminaria japonica*. Carbohydrate polymers, 2015. **134**: p. 66–73.
 26. Kim, K.-H., et al., Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Laminaria japonica*. Biotechnology letters, 2006. **28**(6): p. 439–446.
 27. Cao, Y.-g., et al., Antiviral activity of polysaccharide extract from *Laminaria japonica* against respiratory syncytial virus. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016. **84**: p. 1705–1710.
 28. Wang, J., et al., In-vitro anticoagulant activity of fucoidan derivatives from brown seaweed *Laminaria japonica*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011. **29**(3): p. 679–685.
 29. Qiong, L., et al., The effect of *Laminaria japonica* polysaccharides on the recovery of the male rat reproductive system and mating function damaged by multiple mini-doses of ionizing radiations. Environmental toxicology and pharmacology, 2011. **31**(2): p. 286–294.
 30. Li, X. and L. Wang, Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides. International journal of biological macromolecules, 2016. **83**: p. 270–276.
 31. Zhang, Z., et al., Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*. Carbohydrate polymers, 2013. **98**(2): p. 1524–1531.
 32. Leite, E.L., et al., Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. Plant science, 1998. **132**(2): p. 215–228.
 33. Hahn, T., et al., Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. Process biochemistry, 2012. **47**(12): p. 1691–1698.
 34. Zhao, D., J. Xu, and X. Xu, Bioactivity of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* using a novel procedure with high yield. Food chemistry, 2018. **245**: p.

- 911–918.
35. Gao, J., et al., A comparison study on polysaccharides extracted from *Laminaria japonica* using different methods: structural characterization and bile acid-binding capacity. *Food & function*, 2017. **8**(9): p. 3043–3052.
 36. Rodrigues, D., et al., Impact of enzyme-and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015. **63**(12): p. 3177–3188.
 37. Wang, T., et al., Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *LWT-Food Science and Technology*, 2010. **43**(9): p. 1387–1393.
 38. 오지현 and 이윤경, 국내산 해조류 4 종의 물과 에탄올 추출물이 3T3-L1 에서 지방세포 분화에 미치는 영향. *동아시아식생활학회지*, 2015. **25**(6): p. 990–998.
 39. Salehi, B., et al., Current Trends on Seaweeds: Looking at Chemical Composition, Phytopharmacology, and Cosmetic Applications. *Molecules*, 2019. **24**(22): p. 4182.
 40. Ramus, J., et al., Changes in photosynthetic pigment concentration in seaweeds as a function of water depth. *Marine Biology*, 1976. **37**(3): p. 223–229.
 41. 박규진 and 최창근, 동해 연안 영일만 조간대 해조류의 군집구조. *한국수산과학회지*, 2009. **42**(6): p. 664–673.
 42. <http://study.zum.com/book/14468>, 마지막 등록: 2020/09/02.
 43. Mikami, K. and M. Hosokawa, Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International journal of molecular sciences*, 2013. **14**(7): p. 13763–13781.
 44. Evans, F. and A. Critchley, Seaweeds for animal production use. *Journal of applied phycology*, 2014. **26**(2): p. 891–899.
 45. Makkar, H.P., et al., Seaweeds for livestock diets: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 2016. **212**: p. 1–17.
 46. Cornish, M.L., A.T. Critchley, and O.G. Mouritsen, Consumption of seaweeds and the human brain. *Journal of Applied Phycology*, 2017. **29**(5): p. 2377–2398.
 47. Wu, S.-C., et al., Antivirus and prebiotic properties of seaweed-oligosaccharide-lysates derived from agarase AS-II. *J. Fish. Soc. Taiwan*,

2012. **39**(1): p. 11–21.
48. Yuan, Y.V. and N.A. Walsh, Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and chemical toxicology*, 2006. **44**(7): p. 1144–1150.
49. Ye, H., et al., Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry*, 2008. **111**(2): p. 428–432.
50. Awang, A.N., et al., Anti-obesity property of the brown seaweed, *Sargassum polycystum* using an *in vivo* animal model. *Journal of applied phycology*, 2014. **26**(2): p. 1043–1048.
51. Sun, Z., et al., Antiobesity, antidiabetic, antioxidative, and antihyperlipidemic activities of bioactive seaweed substances, in *Bioactive seaweeds for food applications*. 2018, Elsevier. p. 239–253.
52. Le Bail, A., et al., Normalisation genes for expression analyses in the brown alga model *Ectocarpus siliculosus*. *BMC molecular biology*, 2008. **9**(1): p. 75.
53. Davis, T.A., B. Volesky, and A. Mucci, A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water research*, 2003. **37**(18): p. 4311–4330.
54. Chengkui, Z. and Z. Junfu. Chinese seaweeds in herbal medicine. in *Eleventh International Seaweed Symposium*. 1984. Springer.
55. Liu, L., et al., Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*, 2012. **142**(3): p. 591–619.
56. Song, X.-h., et al., Effects of modified Haizao Yuhu Decoction in experimental autoimmune thyroiditis rats. *Journal of ethnopharmacology*, 2011. **135**(2): p. 321–324.
57. Park, H.-K., et al., Induction of apoptosis by laminarin, regulating the insulin-like growth factor-IR signaling pathways in HT-29 human colon cells. *International journal of molecular medicine*, 2012. **30**(4): p. 734–738.
58. Rabillé, H., et al., Alginates along the filament of the brown alga *Ectocarpus* help cells cope with stress. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 1–17.
59. Vo, T.S., et al., The suppressive activity of Fucofuroeckol-A derived from brown

- algal *ecklonia stolonifera* okamura on UVB-induced mast cell degranulation. *Marine drugs*, 2018. **16**(1): p. 1.
60. Silva, J., et al., Antioxidant and Neuroprotective Potential of the Brown Seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an *in vitro* Parkinson's Disease Model. *Marine drugs*, 2019. **17**(2): p. 85.
61. Song, Y., et al., Structural characterization and antitumor effects of fucoidans from brown algae *Kjellmaniella crassifolia* farmed in northern China. *International journal of biological macromolecules*, 2018. **119**: p. 125–133.
62. Airanthi, M.W.A., M. Hosokawa, and K. Miyashita, Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *Journal of Food Science*, 2011. **76**(1): p. C104–C111.
63. Marudhupandi, T., et al., *In vitro* anticancer activity of fucoidan from *Turbinaria conoides* against A549 cell lines. *International journal of biological macromolecules*, 2015. **72**: p. 919–923.
64. Kim, D.-W., et al., Direct acting anti-thrombotic serine protease from brown seaweed *Costaria costata*. *Process Biochemistry*, 2013. **48**(2): p. 340–350.
65. Kellogg, J., et al., Alaskan seaweeds lower inflammation in RAW 264.7 macrophages and decrease lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Functional Foods*, 2015. **15**: p. 396–407.
66. Kang, B.-K., et al., Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 2014. **46**(6): p. 729–733.
67. de Jesus Raposo, M.F., A.M.M.B. De Morais, and R.M.S.C. De Morais, Emergent sources of prebiotics: seaweeds and microalgae. *Marine drugs*, 2016. **14**(2): p. 27.
68. Kumar, C.S., et al., Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2008. **45**(1): p. 1.
69. Mišurcová, L., Chemical composition of seaweeds. 2012, Wiley Online Library.
70. Rupérez, P., Mineral content of edible marine seaweeds. *Food chemistry*, 2002. **79**(1): p. 23–26.
71. Deyuan, L., X. XIANBO, and X. LIANG, Review on Health Function of *Laminaria*

- Japonica* Aresch and Its Biologically Active Polysaccharides [J]. Food Science, 2002. 7.
72. Go, H., H.-J. Hwang, and T.-J. Nam, A glycoprotein from *Laminaria japonica* induces apoptosis in HT-29 colon cancer cells. Toxicology *in Vitro*, 2010. **24**(6): p. 1546-1553.
73. Lee, J.-Y., et al., Hexane fraction from *Laminaria japonica* exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via inhibiting NF-kappaB pathway. European journal of nutrition, 2013. **52**(1): p. 409-421.
74. Huang, L., et al., Hypolipidemic effect of fucoidan from *Laminaria japonica* in hyperlipidemic rats. Pharmaceutical Biology, 2010. **48**(4): p. 422-426.
75. Zha, X.-Q., et al., Polysaccharides in *Laminaria japonica* (LP): Extraction, physicochemical properties and their hypolipidemic activities in diet-induced mouse model of atherosclerosis. Food Chemistry, 2012. **134**(1): p. 244-252.
76. Hsu, W.-J., et al., Fucoidan from *Laminaria japonica* exerts antitumor effects on angiogenesis and micrometastasis in triple-negative breast cancer cells. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **149**: p. 600-608.
77. Lee, S.-J., et al., Anti-hyperlipidemia and anti-arteriosclerosis effects of *Laminaria japonica* in Sprague-Dawley rats. Fisheries and aquatic sciences, 2011. **14**(4): p. 235-241.
78. Wang, J., et al., Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. International Journal of Biological Macromolecules, 2008. **42**(2): p. 127-132.
79. Wang, J., et al., Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. International journal of biological macromolecules, 2010. **46**(1): p. 6-12.
80. Zhao, X., et al., Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. Thrombosis research, 2016. **144**: p. 46-52.
81. Black, W., The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British Laminariaceae and fucaceae. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1954. **5**(9): p. 445-448.

82. YUAN, S., et al., Therapeutic effect of relative low mass weight fucoidan from *Laminaria japonica* on acetic acid-induced gastric ulcers rats. Chinese Journal of Marine Drugs, 2013. **4**.
83. Li, N., Q. Zhang, and J. Song, Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats. Food and Chemical Toxicology, 2005. **43**(3): p. 421–426.
84. Liu, M., et al., Antibacterial activity and mechanisms of depolymerized fucoidans isolated from *Laminaria japonica*. Carbohydrate polymers, 2017. **172**: p. 294–305.
85. Priyan Shanura Fernando, I., et al., Algal polysaccharides: potential bioactive substances for cosmeceutical applications. Critical reviews in biotechnology, 2019. **39**(1): p. 99–113.
86. Park, J.-N., et al., Production of reducing sugars from *Laminaria japonica* by subcritical water hydrolysis. APCBEE Procedia, 2012. **2**: p. 17–21.
87. Islam, M., et al., Effect of sea tangle (*Laminaria japonica*) and charcoal supplementation as alternatives to antibiotics on growth performance and meat quality of ducks. Asian–Australasian journal of animal sciences, 2014. **27**(2): p. 217.
88. Bilal, M. and H. Iqbal, Marine Seaweed Polysaccharides–Based Engineered Cues for the Modern Biomedical Sector. Marine Drugs, 2020. **18**(1): p. 7.
89. Min, F.-F., et al., Study on colon health benefit of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves *in vivo*. Journal of Functional Foods, 2014. **11**: p. 203–209.
90. Zhang, M., et al., Characterization of *Lycium barbarum* polysaccharide and its effect on human hepatoma cells. International journal of biological macromolecules, 2013. **61**: p. 270–275.
91. Yang, X.-m., et al., Antioxidant and immunity activity of water extract and crude polysaccharide from *Ficus carica* L. fruit. Plant Foods for Human Nutrition, 2009. **64**(2): p. 167–173.
92. Wong, K.H. and P.C. Cheung, Effect of fiber-rich brown seaweeds on protein bioavailability of casein in growing rats. International journal of food sciences and nutrition, 2003. **54**(4): p. 269–279.

93. Rajapakse, N. and S.-K. Kim, Nutritional and digestive health benefits of seaweed, in *Advances in food and nutrition research*. 2011, Elsevier. p. 17–28.
94. Li, Q., et al., Biochemical characterization and elucidation of action pattern of a novel polysaccharide lyase 6 family alginate lyase from marine bacterium *Flammeovirga* sp. NJ-04. *Marine drugs*, 2019. **17**(6): p. 323.
95. Senthilkumar, K., et al., Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International journal of biological macromolecules*, 2013. **60**: p. 366–374.
96. Matou, S., et al., Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis *in vitro*. *Thrombosis research*, 2002. **106**(4–5): p. 213–221.
97. Xue, M., et al., Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *PLoS one*, 2012. **7**(8): p. e43483.
98. Kadam, S.U., B.K. Tiwari, and C.P. O'Donnell, Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015. **50**(1): p. 24–31.
99. Nathan, C. and A. Ding, Nonresolving inflammation. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 871–882.
100. Sindhu, S., et al., The Cooperative Induction of CCL4 in Human Monocytic Cells by TNF- α and Palmitate Requires MyD88 and Involves MAPK/NF- κ B Signaling Pathways. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(18): p. 4658.
101. Youssef, A.-R., et al., Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC oral health*, 2019. **19**(1): p. 133.
102. Sabino, J., et al., New biologics and small molecules in inflammatory bowel disease: an update. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 2019. **12**: p. 1756284819853208.
103. Shoelson, S.E., L. Herrero, and A. Naaz, Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 2007. **132**(6): p. 2169–2180.
104. Sethi, G., et al., Multifaceted link between cancer and inflammation. *Bioscience reports*, 2012. **32**(1): p. 1–15.
105. Liu, F., et al., Immunomodulatory effects of xanthan gum in LPS-stimulated RAW

- 264.7 macrophages. Carbohydrate polymers, 2017. **169**: p. 65–74.
106. Mills, C., M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 2012. **32**(6).
107. Abumaree, M., et al., Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2013. **9**(5): p. 620–641.
108. Wang, N., H. Liang, and K. Zen, Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Frontiers in immunology*, 2014. **5**: p. 614.
109. Barros, M.H.M., et al., Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PloS one*, 2013. **8**(11).
110. Mills, C.D., et al., M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of immunology*, 2000. **164**(12): p. 6166–6173.
111. Coleman, J.W., Nitric oxide in immunity and inflammation. *International immunopharmacology*, 2001. **1**(8): p. 1397–1406.
112. Aoki, T. and S. Narumiya, Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends in pharmacological sciences*, 2012. **33**(6): p. 304–311.
113. Silswal, N., et al., Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 in macrophages by NF- κ B-dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005. **334**(4): p. 1092–1101.
114. Kang, M.-C., et al., Anti-inflammation effects of 8-oxo-9-octadecenoic acid isolated from *Undaria peterseniana* in lipopolysaccharide-stimulated macrophage cells. *EXCLI journal*, 2018. **17**: p. 775.
115. McGettrick, A.F. and L.A. O'Neill, How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. **288**(32): p. 22893–22898.
116. Abramson, S.B., et al., The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2001. **15**(5): p. 831–845.
117. Opal, S.M. and V.A. DePalo, Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 2000. **117**(4): p. 1162–1172.

118. Tang, S., et al., Cryptotanshinone suppressed inflammatory cytokines secretion in RAW 264. 7 macrophages through inhibition of the NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Inflammation*, 2011. **34**(2): p. 111-118.
119. Moon, J., et al., The Effect of Early Escharectomy on Pro-and Anti-inflammatory Cytokines in Major Burn Patients. *Korean Journal of Anesthesiology*, 2003. **45**(2): p. 232-237.
120. Suzuki, T., Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and molecular life sciences*, 2013. **70**(4): p. 631-659.
121. Pedersen, B.K., et al., Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflügers Archiv*, 2003. **446**(1): p. 9-16.
122. Petersen, A. and B. Pedersen, The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory. *J Physiol Pharmacol*, 2006. **57**(Suppl 10): p. 43-51.
123. Ostrowski, K., et al., Pro-and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *The Journal of physiology*, 1999. **515**(1): p. 287-291.
124. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 2001. **19**(1): p. 683-765.
125. 周琳, 周光炎, and 路丽明, IL-10 的双向免疫调节作用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012. **28**(10): p. 1100-1102.
126. Lauw, F.N., et al., Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *The Journal of Immunology*, 2000. **165**(5): p. 2783-2789.
127. O'Garra, A., et al., Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological reviews*, 2008. **223**(1): p. 114-131.
128. Tilg, H., et al., Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon γ . *Gut*, 2002. **50**(2): p. 191-195.
129. Bello-Irizarry, S.N., et al., The alveolar epithelial cell chemokine response to pneumocystis requires adaptor molecule MyD88 and interleukin-1 receptor but not toll-like receptor 2 or 4. *Infection and immunity*, 2012. **80**(11): p. 3912-3920.
130. Patsouris, D., et al., Insulin resistance is associated with MCP1-mediated macrophage accumulation in skeletal muscle in mice and humans. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e110653.

131. Wang, X., et al., Lipopolysaccharide and palmitic acid synergistically induced MCP-1 production via MAPK-mediated TLR4 signaling pathway in RAW 264. 7 cells. *Lipids in health and disease*, 2019. **18**(1): p. 1-9.
132. Folin, O. and W. Denis, On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 1912. **12**(2): p. 239-243.
133. Re, R., et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 1999. **26**(9-10): p. 1231-1237.
134. Bae, M.J., et al., Evaluation of effective MMP inhibitors from eight different brown algae in human fibrosarcoma HT1080 cells. *Preventive nutrition and food science*, 2015. **20**(3): p. 153.
135. 백수현, et al., 다시마의 건조 과정 중에 발생하는 후코잔틴 (fucoxanthin) 과 총항산화능의 변화. *한국식품과학회지*, 2019. **51**(6): p. 524-530.
136. 권유리 and 윤광섭, 추출방법에 따른 톳 추출물의 항산화 및 생리활성 특성. *한국식품저장유통학회지*, 2017. **24**(5): p. 631-637.
137. Wan, P., et al., Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Laminaria japonica* and their antioxidative and glycosidase inhibitory activities. *Journal of Ocean University of China*, 2015. **14**(4): p. 651-662.
138. Kouka, P., et al., Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International journal of molecular medicine*, 2017. **40**(3): p. 703-712.
139. Salar, R.K., M. Certik, and V. Brezova, Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 2012. **17**(1): p. 109-116.
140. 김동섭, et al., RAW 264. 7 대식세포에서 팽생이 모자반 추출물의 면역활성 증진 효과. *Journal of Nutrition and Health*, 2018. **51**(6): p. 507-514.
141. Jeong, S.C., et al., Immune-modulating activities of polysaccharides extracted from brown algae *Hizikia fusiforme*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2015. **79**(8): p. 1362-1365.
142. Ye, J., et al., Fucoidan Isolated from *Saccharina japonica* Inhibits LPS-Induced

Inflammation in Macrophages via Blocking NF- κ B, MAPK and JAK-STAT Pathways.
Marine drugs, 2020. **18**(6): p. 328.

143. Park, S.K., et al., Inhibition of acute phase inflammation by *Laminaria japonica* through regulation of iNOS-NF- κ B pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013. **2013**.

<국문초록>

다시마 물 추출물과 다시마 유래 다당류의 이화학적 특성 및 항염증 효과

崔佳美

濟州大學校 大學院 食品營養學科

指導教授 李允京

염증이란 체내의 면역세포가 외부로부터 물리적, 화학적 자극이나 세균감염을 인지하여 다양한 염증매개 물질을 분비함으로써 손상된 조직을 재생하려는 우리 몸의 자연 방어 기전이다. 신체활동 부족, 비만, 스트레스와 같은 외적요인과 영양결핍, 영양 불균형, 활성산소 등의 내적요인으로 인해 우리 몸에서는 자연스러운 염증반응이 일어나게 된다. 하지만 만성 염증 상태가 지속되면 동맥경화, 심혈관질환, 당뇨, 암과 같은 질병을 유발하게 된다. 따라서 연구자들이 염증을 치료하기 위해 부작용이 없는 천연물질에 대한 관심이 많아지고 있으며 그에 대한 식이요법, 기능성 식품 등의 개발을 꾸준히 진행하고 있다.

해조류는 광합성에 따라 색소 생성 정도에 따라서 녹조류, 갈조류, 홍조류로 나눈다. 그 중에서 한국, 중국 같은 아시아 사람들이 제일 많이 소비하는 해조류는 갈조류이다. 특히, 갈조류인 다시마는 일상생활에서 쉽게 접할 수 있으며 식이 섬유, 무기질 등 풍부하고 항당뇨, 항비만, 항염증, 장 건강 증진효과 등 여러 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

해조류의 추출물의 추출방법 및 추출 시료 등에 따라 추출물에 함유되어 있는 성분에 유의적인 차이가 발생하며 이에 따른 생리적인 효과도 크게 다르다. 특히 해조류의 주성분인 식이 섬유소 (다당류)의 다양한 종류와 생리활성은 이미 보고된 바 있으나, 해조류 추출물과 다당류의 직접적인 비교 데이터는 미비한 상황이다. 이에 선행연구 결과에 기반하여 본 연구에서는 다시마에서 정제된 다당류가 다시마의 유의한 효과에 담당하는 성분이라는 가설을 세우고, 다시마물 추출물 (LJE)와 다시마유래 다당류 (LJPS)의 이화학적 특성의 비교와 항염증에 초점을 둔 생리활성 효과를 비교하고 그 기전에 대해 연구해 보고자 하였다.

이화학적 특성 분석으로 총 폴리페놀 함량, ABTS 라디칼 소거능 측정, DPPH 라디칼 소거능 측정을 실시하였다. MTT assay를 통한 RAW 264.7 세포에서 세포 독성과 적정 처치농도를 결정하였다. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성량을 확인하였고 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 mRNA 발현 정도를 RT-PCR를 통해 측정하였다. 더불어 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 단백질 생성량을 ELISA assay로 확인하였다.

LJE의 총 폴리페놀 수치는 2.163 μg GAE/mg이고, LJPS에서는 검출되지 않았다. 이는 다시마에서 다당류를 분리·정제하는 과정에서 가열, 필터 및 여과 등을 거쳐 폴리페놀이 소실되는 것으로 사료된다. LJE는 LJPS보다 ABTS 라디칼 소거능력 더 좋은 것으로 나타났고 LJE, LJPS는 1 mg/ml 농도까지 유의적인 DPPH 라디칼 소거능은 관찰되지 않았다. 세포독성 측정결과에서 LJE는 RAW 264.7 세포에 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 독성이 나타났고, LJPS는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 독성이 나타내지 않았다. 본 연구에서 LJE, LJPS의 농도는 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 선정해서 진행했다. NO 생성량을 측정한 결과에서 LJPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군은 대조군 보다 유의적으로 높은 NO 생성량을 보였고 LJE (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LJPS (1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처치군은 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성량을 유의적으로 감소하였다. 따라서 LJE가 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과가 가지는 것을 알 수 있으며 LJPS가 RAW 264.7 세포에서 양면적

염증조절 효과가 가지는 것을 알 수 있다. mRNA 측정결과에서 LPS 자극으로 인해 증가한 TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1의 발현이 유의적인 차이 보이지 않았지만 LPS가 염증을 유도하는 RAW 264.7 세포에서 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-10)을 유의적으로 감소하는 것을 관찰했다. 따라서 LJE 및 LJPS의 염증조절 기전이 전사 과정 (transcriptional level) 혹은 번역 과정 (translational level)에 기인하는지에 대해서는 추가 실험이 필요하다.

본 연구를 통해 우리는 항산화 효과가 LJPS의 주요 생리활성이 아님을 알 수 있었으며, 다시마 유래 물질 2종 (LJE, LJPS)은 모두 대식세포의 면역조절 효과를 가지지만 그 조절 기전은 다름을 보여주었다. 즉, 대식세포에서 LJE는 항염증 효과, LJPS 양면적인 면역조절효과를 보유하고 있었다. LJPS는 특정 농도에 따라 대식세포에서 면역활성 작용과 항염증 효과를 동시에 가지고 있다. 결론적으로 LJE와 LJPS는 식품 첨가물과 면역 조절 기능을 보유하고 있는 기능성 천연 소재로의 가능성을 확인하였다.