

생체 외 및 생체 내 실험을 통한 모무늬돌김(*Pyropia seriata*) 열수추출물의 면역 증진 효과

이슬아 · 최진실 · 김춘성*

조선대학교 치의예과

Immune-enhancing Effect of Aqueous Extract of *Pyropia seriata* *In vitro* and *In vivo*

Seul Ah Lee, Jin Shil Choi and Chun Sung Kim*

Department of Oral Biochemistry, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

Pyropia seriata (PS), a seaweed belonging to the red algae family, is mainly cultivated in the coastal areas of Korea and Japan. PS has been reported to have functions related to heat stress tolerance; however, its other functions remain unclear. Therefore, in this study, we investigated the immune-enhancing effects of aqueous extract of PS (AePS) using mouse RAW264.7 macrophages and cyclophosphamide (CPA)-induced immuno-suppressed experimental animals. AePS significantly increased the expression of nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α without toxicity in RAW264.7 cells. Western blotting and NO assay confirmed that these effects were mediated through the mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B signaling pathways. Daily oral administration of AePS to CPA-induced immune-suppressed animals for two weeks restored the size of their spleen to that of normal animals and caused a significant increase in splenocyte proliferation. The results of this study suggest that PS exerts an immune-enhancing effect by inducing the expression of pro-inflammatory cytokines, indicating its potential application as an immune-related functional materials.

Keywords: Immunity, Macrophages, *Pyropia seriata*, Seaweed, Splenocytes

서론

지난 70여 년간 질병을 치료하기 위한 항생제의 남용은 항생제 내성 박테리아의 등장을 초래하였다(Khan et al., 2021; Khatua et al., 2022). 항생제 내성은 미생물이 항생제에 저항하여 생존하거나 일부 유전자를 다른 균으로 이동하여 내성을 전파하면서 치료를 어렵게 한다(Martinex, 2014). 따라서, 항생제 내성을 예방하고 질병으로부터 인체를 보호하기 위해 면역력을 증진시키는 다양한 활동 및 식품 섭취로 그 치료 전략이 바뀌었다(Pezzanite et al., 2021). 면역 반응은 내부 또는 외부 물질로부터 인체를 보호하는 일차적인 신체 방어 시스템이다. 면역 체계가 손상되면 인체는 방어 능력을 잃고 질병이 쉽게 노출되며 회복을 더디게 한다(Yatim and Lkkis, 2015). 인체 면역 시스템은 크게 선천 면역과 후천 면역으로 나눌 수 있다(Cooper and Alder, 2006; Yatim and Lkkis, 2015; Gourbal et al., 2018). 선

천 면역은 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 자연 살해 세포가 매개하는 비특이적 면역 반응을 수반하며 외부 항원에 신속하게 반응합니다(Gourbal et al., 2018). 반면 적응 면역은 항원 특이적이며 T 세포와 B 세포의 참여를 수반한다(Cooper and Alder, 2006; Suddep et al., 2023). 그 중 대식세포는 항원에 의해 가장 먼저 활성화되며 그 즉시 일산화질소(nitric oxide, NO)와 면역 활성 매개체의 분비를 증가시켜 체내 유해 박테리아의 증식을 억제한다(Hirayama et al., 2017; Monmai et al., 2022). 또한 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) 및 인터루킨-6 (interluekin-6, IL-6)과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 식세포 활동을 강화하거나 자연살해세포 및 수지상세포와 같은 선천 면역 세포의 활성화를 유도한다(Martinez et al., 2008; Hirayama et al., 2017). 대식세포는 T세포 활성화에 기여하고 신체 내 세포 활동과 면역 반응을 매개하는 데 중추적인 역할을 하기 때문에 많은 면역 관련 연구는 대식세포의 활성, 증

*Corresponding author: Tel: +82. 62. 230. 7088 Fax: +82. 62. 232. 6896

E-mail address: cskim2@chosun.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0676>

Korean J Fish Aquat Sci 57(6), 676-683, December 2024

Received 29 September 2024; Revised 4 November 2024; Accepted 12 November 2024

저자 직위: 이슬아(연구교수), 최진실(대학원생), 김춘성(교수)

식, 사이토카인 분비능을 지표로 설정하고 있다.

김(laver)은 김파래과에 속하는 홍조류로 대한민국 전 연안 또는 일본 등지에 분포하고 있다. 김은 맛과 향미가 뛰어나며 단백질과 식이섬유가 풍부하여 예로부터 약용 또는 식용으로 이용되어왔다(Cho et al., 2021; Kim and Park, 2023). 대한민국 연안에서 주로 채취되는 김은 크게 3가지로 볼 수 있으며, 방사무늬김(*Pyropia yezoensis*), 잇바디돌김(*Neoporphyra dentata*), 모무늬돌김(*Pyropia seriata*)이다(Cho et al., 2021). 가장 생산량이 많은 방사무늬김은 다른 김에 비해 기능성 연구는 상대적으로 많이 보고되어 있지만, 잇바디돌김과 모무늬돌김에 관한 과학적 연구는 열 스트레스 내성, 항산화, 피부 주름 개선이며 유전체 서열에 대한 분석이다(Park et al., 2012; Choi et al., 2019; Cho et al., 2021). 항염증, 항산화, 항혈액응고와 같은 해조류의 생리활성은 대부분 해조류에 다량 함유된 다당류에 의한 것으로 알려져 있으며, 홍조류의 주요 다당류는 갈락탄이다(Yu et al., 2018; Liu et al., 2019). 갈락탄 중에서 아가로스, 카라기난, 자일란, 포르피란, 홍조녹말(아밀로펙틴) 등이 있으며, 카라기난과 포르피란은 면역력 증진, 항염증에 대한 기능성이 보고되어 있다(Liu et al., 2019). λ -카라기난은 M1 대식세포의 유입을 증가시키고 CD4+, CD8+ T 림프구의 활성을 유도함으로써 면역력을 증가시켜 항암활성을 유도하며, 카라기난 올리고다당류는 IL-2 (interleukin-2)와 TNF- α 의 분비를 유도하여 대식세포의 식세포 작용을 증가시킴으로써 면역반응을 촉진한다고 보고되어 있다(Luo et al., 2015).

본 연구에서는 모무늬돌김 열수 추출물을 활용하여 생체 외(*in vitro*)와 생체 내(*in vivo*) 실험을 통해 면역증진 활성 및 그 기전을 연구하였다.

재료 및 방법

모무늬돌김 열수 추출물 제조(AePS)

모무늬돌김은 2022년 2월 전라남도 해남에서 채취한 것을 구입하였으며, 담수로 가볍게 수세하고 32배수의 물을 이용하여 90–93°C에서 4시간 동안 추출하였다. 추출물은 -20°C에서 보관하며 실험에 이용하였으며, 한번 녹인 것은 4°C에 보관하였다.

세포배양

마우스 대식세포 RAW264.7은 한국생명공학연구소(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea)에서 제공받았으며, 비장세포는 실험동물로부터 분리하여 사용하였다. RAW264.7세포와 비장세포는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Welgene, Geongsan, Korea)에 10% FBS (fetal bovine serum; ATLAS biological, Fort Collins, CO, USA)와 1% 항생제(100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, Welgene, Geongsan, Korea)가 함유되어 있

는 성장배지를 이용하여 배양하였으며, 배양 조건은 5% CO₂, 37°C를 유지하였다.

세포 성장률 분석

AePS에 대한 세포 생존율을 분석하기 위해 12 well 세포배양 접시에 RAW264.7 세포를 1×10^6 cells/well로 접종한 뒤, 1시간 후 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL의 AePS를 처리한 다음 24시간 동안 반응하였다. 세포 생존율 분석은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 기법을 이용하였으며, MTT 용액(0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 3시간 반응한 뒤 dimethyl sulfoxide를 이용하여 생성된 formazan염을 용해하였다. 이후 microplate reader (Epoch; Bio Tek instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물을 처리하지 않는 대조군의 흡광도를 100%로 설정하여 실험군의 흡광도와 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

질산염(Nitric oxide) 분석

12 well 세포배양 접시에 RAW264.7 세포를 1×10^6 cells/well로 접종한 뒤, 1시간 후 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL의 AePS와 LPS (lipopolysaccharide; 0.1 μ g/mL)를 처리한 다음 24시간 동안 반응하였다. 배양 후, 100 μ L의 배양 상층액을 동량의 griess 시약과 혼합한 뒤 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 질산염에 대한 표준 검량선은 NaNO₂를 이용하였다

단백발현 분석

6 well 세포배양 접시에 RAW264.7 세포를 1×10^6 cells/well로 접종한 뒤, 1시간 후 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL의 AePS와 LPS (0.1 μ g/mL)를 처리한 다음 24시간 동안 반응하였다. 단백질은 protein lysis buffer (iNtRON biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 추출하였으며, 정량은 Pierce™ BCA Protein kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하였으며, 제조사 프로토콜대로 수행하였다.

각 샘플의 15 μ g 단백질을 취한 후, 5X sample buffer와 혼합하여 95°C에서 3분간 변성시킨 뒤, 10–14% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis에서 단백질 크기별로 분리하였다. 이후, polyvinylidene fluoride membrane으로 크기별로 분리된 단백질을 이동하였다. Membrane은 5% bovine serum albumin에서 1시간 동안 반응한 뒤, 특정 1차 항체와 4°C에서 overnight 반응하였다. 이후, tween-20이 함유된 tris-buffered saline로 5분씩 총 3번 세척한 후 horseradish peroxidase가 접합된 2차 항체와 1시간 반응한 다음 ECL kit (Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 ImageQuant™ LAS 4000 mini (GE HealthCare, CHI, IL, USA)를 통해 protein band를 검출하였다.

실험동물 사육

6주령 C57BL/6 마우스는 다물 사이언스에서 구입하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 일주일 동안 순응 기간을 가졌다. 실험동물의 사육방법 및 실험 방법은 조선대학교 실험동물윤리위원회로부터 승인받았다(승인번호: CIA-CUC2024-A0018).

생체 외 면역증진 실험

30마리 실험동물은 랜덤으로 5마리씩 6 그룹화하였으며, group 1은 대조군, group 2는 cyclophosphamide (CPA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 투여군, group 3-6은 각각 CPA+AePS 25, 50, 100 mg/kg, β -glucan군이다. 경구투여 3일 전에 150 mg/kg의 CPA를 투여하고 1일 전에 110 mg/kg의 CPA를 투여하였으며, 다음날부터 2주간 매일 경구투여하였다. 경구투여 종료 후 실험동물을 모두 희생한 뒤 실험동물의 몸무게와 비장 무게 및 크기를 측정 후 채혈하였다.

통계적 유의성

모든 실험성적은 Mean \pm SD로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 Graphpad prism 5.0을 이용하여 turkey t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만(P<0.05)의 경우에 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

마우스 대식세포 RAW264.7 생존율에 대한 AePS의 효과

마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 AePS의 세포독성을 분석하기 위해 대식세포에 AePS와 LPS를 처리하고 24시간 반응한 뒤 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, AePS 0.4 mg/mL까지 RAW264.7 세포에 대한 생존에 영향이 없었으며, LPS 또한 생존에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

마우스 대식세포 RAW264.7세포에서 AePS의 Nitric oxide, iNOS, IL-6 및 TNF- α 에 대한 효과

AePS가 면역증진효과가 있는지 알아보기 위해, 전 염증성 매개체와 사이토카인의 발현을 분석하였다. 대식세포에 AePS와 LPS를 처리하고 24시간 뒤 배양액과 세포를 수확하여 NO 측정과 사이토카인 단백질 발현 변화를 분석하였다. 그 결과 대조군(1.81 \pm 0.38 μ M)과 비교했을 때, AePS는 농도-의존적으로 NO 생성을 증가시켰으며, 0.1, 0.2 및 0.4 mg/mL에서 각각 9.88 \pm 0.09 μ M, 21.06 \pm 0.57 μ M 및 40.23 \pm 1.82 μ M이었으며, LPS는 60.36 \pm 2.29 μ M이었다(Fig. 2A). 또, Fig. 2A 결과와 일치하게 iNOS의 단백질 발현이 AePS 농도의존적으로 점차 증가하였으며 이때, 사이토카인(IL-6 및 TNF- β)의 발현 역시 점차 증가하였다(Fig. 2B).

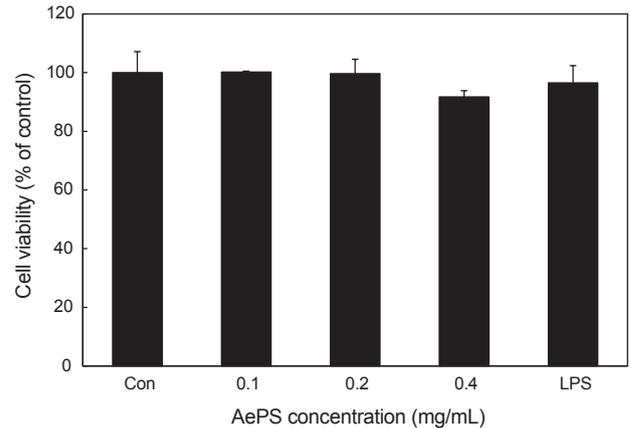


Fig. 1. Cell viability of AePS on RAW264.7 cells. Cells were treated with AePS (0.1, 0.2 and 0.4 mg/mL) and LPS (0.1 μ g/mL) for 24 h. Cell viability was determined using an MTT assay. Data are means \pm SD of three independent experiments. AePS, Aqueous extract of *Pyropia seriata*; LPS, Lipopolysaccharide.

마우스 대식세포 RAW264.7세포에서 AePS의 MAPKs와 NF- κ B 신호전달체계를 통한 면역증진 효과

MAPK와 NF- κ B 신호전달체계는 세포의 성장, 분화, 분열 등 뿐만 아니라 염증, 항산화, 면역 조절에도 관여하는 것으로 세포 생리에서 매우 중요한 신호전달체계이다. AePS에 의한 NO 분비 증가와 사이토카인 발현 증가가 MAPK와 NF- κ B에 의해 매개되는지를 western blot을 통해 분석하였다. 그 결과, AePS는 extracellular signal-regulated kinase, jun N-terminal kinases 및 P38의 총 발현양에는 영향을 주지 않고 인산화를 유의적으로 유도하였다(Fig. 3A). 또, AePS는 I κ B의 인산화를 유도함으로써 I κ B가 분해되었고, NF- κ B subunit p65가 핵 내로 이동하였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 AePS에 의한 면역 증진 효과가 MAPK와 NF- κ B 신호전달경로를 통해 매개될 수 있음을 시사한다.

면역 억제 실험동물에서 AePS의 면역증진 효과

CPA를 복강투여하여 면역억제된 실험동물에 2주간 AePS를 경구투여하였다. 2주 후 실험동물로부터 비장조직을 채취하여 분석한 결과, 대조군에 비해 CPA를 투여받은 군에서 비장의 크기가 현저히 작아졌으나 50 및 100 mg/kg AePS를 투여받은 군에서 비장의 크기가 점차 회복되었으며, 특히 β -glucan을 투여받은 군의 비장조직은 정상과 유사하게 회복하였다(Fig. 4A). AePS의 비장세포 증식능력에 대한 영향을 분석하기 위해 비장 조직에서 비장세포를 분리하여 mitogen (LPS 및 ConA)이 있고 없는 조건에서 48시간을 배양하였다. 그 결과, mitogen이 있는 조건뿐만 아니라 mitogen이 없는 조건에서도 AePS는 비장세포의 증식을 유도하였다(Fig. 4B-4D). 이러한 결과는 AePS가 비장세포 증식을 통해 면역증진 효과를 나타냄을 시사한다.

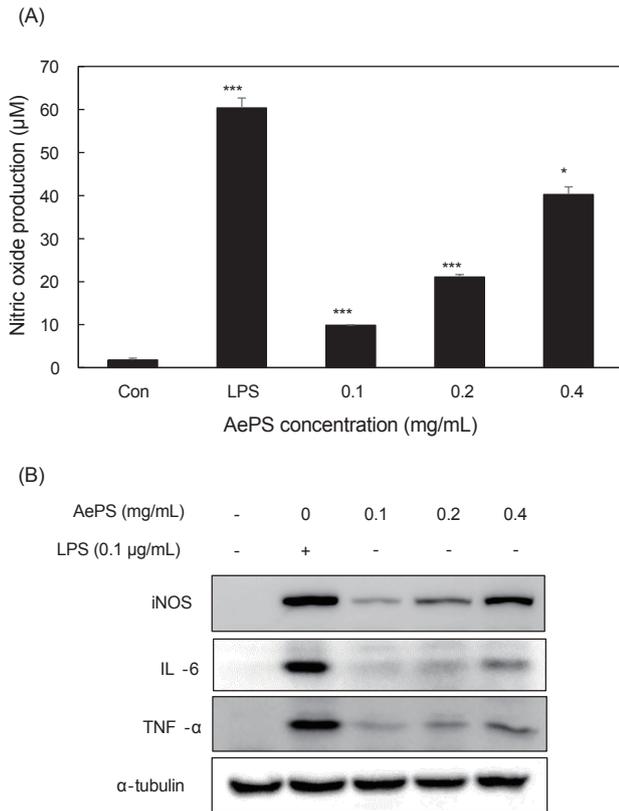


Fig. 2. Effects of AePS on the expression levels of nitric oxide, iNOS, TNF-α and IL-6 in RAW264.7 cells. Cells were treated with AePS (0.1, 0.2 and 0.4 mg/mL) and LPS for 24 h. A, Nitrite production was determined in conditioned medium using Griess reagent; B, Expression of iNOS, IL-6, and TNF-α was determined using western blot analysis. α-tubulin served as internal control. Data are means±SD of three independent experiments. *P< 0.05, ***P< 0.001 compared with control group. AePS, Aqueous extract of *Pyropia seriata*; iNOS, Inducible nitric oxide synthase; TNF-α, Tumor necrosis factor-α; IL-6, Interleukin-6; LPS, Lipopolysaccharide.

고찰

모무늬돌김은 대한민국 전 연안에서 10월부터 이듬해 4월까지 채취하는 김 종류 중 하나로, 구이용 또는 김자반용으로 사용된다. 모무늬돌김은 건조와 열 스트레스를 포함하는 조수의 변화에 따른 역동적인 환경 변화에 노출된 조건에 암석에서 자란다(Cho et al., 2021). Park et al. (2012)은 모무늬돌김 서열에는 PsHSP70b cDNA가 특히 많이 존재하며, 이 유전자가 열 스트레스에 대한 내성을 올려줌으로써 열 스트레스 조건하에서도 생존과 성장을 할 수 있게 한다고 보고하였다(Park et al., 2012). 특히, 해조류에 다량 함유된 다당류는 황산기가 붙어 있어 육상식물의 다당류보다 세포 흡수가 빠르며 생리활성이 매

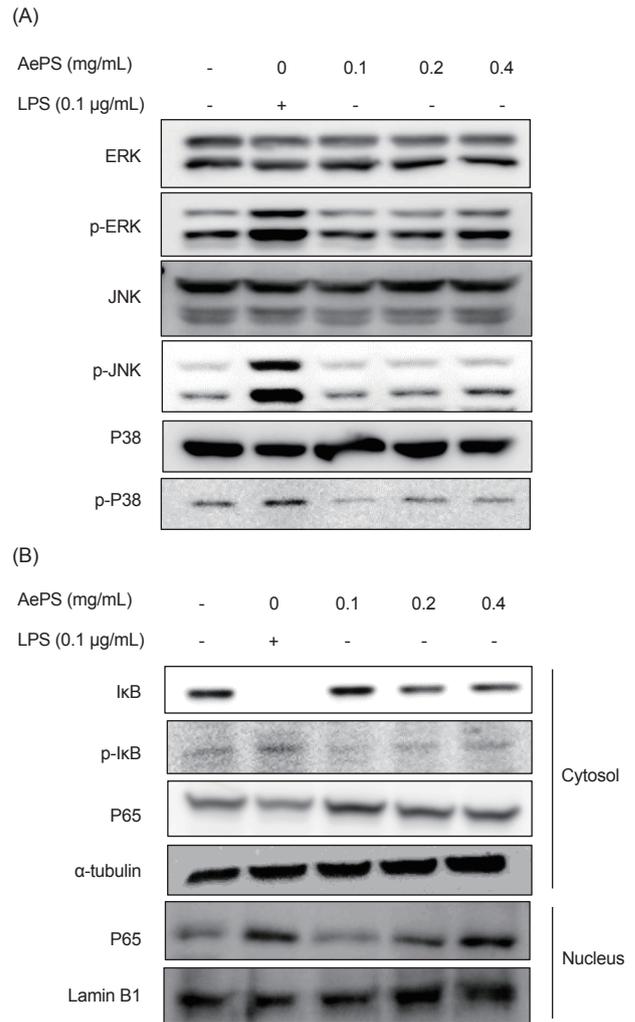


Fig. 3. Effects of AePS on MAPKs and NF-κB in RAW264.7 cells. Cells were treated with AePS (0.1, 0.2 and 0.4 mg/mL) and LPS for 24 h. A, Total and phosphorylated ERK, JNK and p38 were determined using western blot analysis; B, Expression of IκB-α and p65 in cytosolic and nuclear extracts were determined using western blot analysis. α-tubulin and LaminB1 were served cytosolic and nuclear internal controls, respectively. AePS, Aqueous extract of *Pyropia seriata*; MAPKs, Mitogen-activated protein kinase; NF-κB; Nuclear factor kappa B; ERK, Extracellular signal-regulated kinase; JNK, Jun N-terminal kinases; IκB-α, kinases.

우 뛰어난 것으로 보고되어 있으며, 대표적인 해조류 다당류로는 후코이단, 알긴산, 라미나린, 카라기난이다(Liu et al., 2019; Hossain et al., 2023). 홍조류에 함유된 대표적인 다당류는 갈락탄으로 아가로스, 카라기난, 포르피란이 있으며 건조 김의 20-40%는 다당류로 구성되어 있다(Masmila et al., 2014). 특히 포르피란과 카라기난은 면역력을 향상시키고 세포사멸 인자의 활성을 촉발시킴으로써 다양한 암에서 항암 활성을 나타

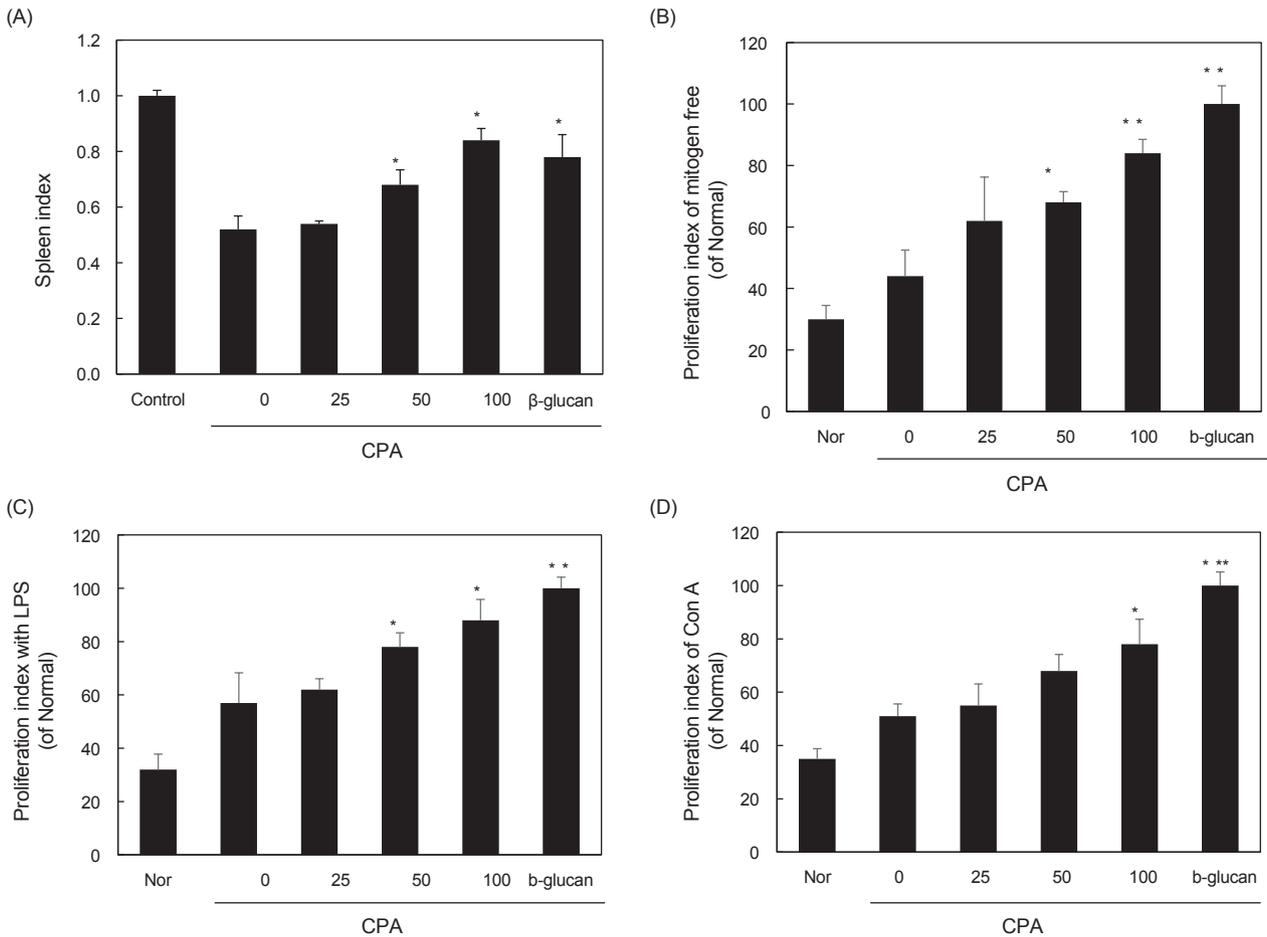


Fig. 4. Effects of AePS on splenocyte proliferation *in vivo*. Experimental animals were administered CPA to induce immunosuppression and then orally administered AePS daily for 2 weeks. Data are means±SD of three independent experiments. A The spleen index was calculated using the size and weight of the spleen and body weight. After isolating splenocytes from the spleen, the splenocytes were cultured under specific conditions [mitogen free-(B), LPS-(C) and Con A-(D)] and splenocyte proliferation was analyzed using MTT assay. Data are means±SD of three independent experiments. *P< 0.05, **P< 0.015, ***P< 0.001 compared with CPA group. AePS, Aqueous extract of *Pyropia seriata*; CPA, Cyclophosphamide; LPS, Lipopolysaccharide.

낸다고 보고되어 있다(Liu et al., 2019). 따라서, 모무늬돌김의 이러한 특징이 면역력 증진에도 관여할 것이라 사료되어, 본 연구에서는 모무늬돌김의 열수 추출을 통해 면역증진 활성을 연구하였다.

대식세포는 인체 면역 시스템에서 중요한 식세포 중 하나이며, 특정 환경 자극에 반응하여 체형(M1 및 M2)을 조절할 수 있는 가소성 세포이다(Martinez et al., 2008; Monmai et al., 2022). M1 대식세포의 활성은 세포 면역 반응을 통해 침입한 항원을 제거하기 위해 iNOS와 다양한 사이토카인을 분비하여 염증 반응에 관여하고, M2 대식세포는 항염증 반응을 유도한다(Atri et al., 2018; Monmai et al., 2022). iNOS는 미생물 손상을 증가시켜 면역 효과를 발휘하는 NO를 합성하여 항원과 싸우는 염증성 매개체이며, IL-6와 TNF-α와 같은 사이토카인은 활성

화된 면역세포에서 분비되어 항균과 항바이러스를 위한 염증과 면역 반응을 조절하여 신체를 항원으로로부터 보호한다(Apetoh et al., 2007; Mansila et al., 2014; Atri et al., 2018). 모무늬돌김은 RAW264.7 세포에 처리하였을 때 MAPK와 NF-κB 신호전달경 활성을 통해 NO, IL-6 및 TNF-α의 발현을 유의적으로 증가시켰으며, 이러한 결과는 모무늬돌김과 다른 품종인 잇바디돌김과 방사무늬돌김의 면역 증진 효과와 일치하는 연구로, 잇바디돌김 10% 에탄올 추출물은 RAW264.7 세포에서 NF-κB 신호전달체계를 통해 IL-10, IL-6 및 TNF-α를 증가시켰으므로 면역 증진을 유도함을 보고하였으며, 방사무늬돌김 열수 추출물은 RAW264.7 세포에서 MAPK와 NF-κB 신호전달경로를 통해 NO, IL-6 및 TNF-α의 발현을 증가시켰으므로 면역 증진 효과가 있다고 보고하였다(Song et al., 2017; Jang et al.,

2023). 우리의 이전 연구인 방사무늬돌김 열수추출물의 면역증진 효과에서의 추출조건과 동일한 조건의 모무늬돌김 열수추출물이며, 방사무늬돌김 열수추출물의 면역 증진 효과는 0.25 mg/mL 부터 유의적인 효과를 나타냈으나 모무늬돌김 열수추출물의 경우 0.1 mg/mL부터 유의적인 효과를 나타낸 것으로 보아 모무늬돌김이 방사무늬돌김 보다 면역 증진에 대한 높은 활성을 나타낸다고 사료된다. 그러나 이러한 효과의 차이는 면역증진에 대한 활성성분분석이 이루어져야 더 명확한 이유를 설명할 수 있다. 잇바디돌김과 모무늬돌김의 일반성분을 연구한 결과에 따르면, 모무늬돌김의 탄수화물 함량이 45.3 g/100 g으로 잇바디돌김보다 더 높은 함량을 나타냈으며, 아미노산 총 함량은 잇바디돌김이 더 높게 나타났다. 또, 총 페놀 함량은 잇바디돌김(108.69 mg/100 g)이 모무늬돌김(77.73 mg/100 g)으로 더 높았으며, 항산화 효과도 우수하였다(Cho et al., 2021). 잇바디돌김과 방사무늬돌김의 일반성분을 비교한 연구를 보면, 유리아미노산 총 함량은 잇바디돌김은 743 mg/100 g인 반면 방사무늬돌김은 5,594 mg/100 g 함유한 것으로 나타났으며, 카로티노이드와 클로로필 함량 역시 방사무늬돌김이 더 높게 나타났다. 또 총 페놀 함량은 방사무늬돌김이 85.77 mg/mL로 잇바디돌김 76.35 mg/mL보다 높게 나타났으며, 플라보노이드 함량 역시 방사무늬돌김(111.80 mg/mL)이 잇바디돌김(51.91 mg/mL) 보다 더 높게 나타났다(Park et al., 2014; Baek et al., 2019). 세가지 김 품종에서 일반성분 분석 연구 결과를 종합하면 모무늬돌김에서 총 페놀과 총 플라보노이드 함량이 가장 낮은 것으로 분석되었으나 열수추출물이 아닌 건물 기준의 분석이므로 향후 열수추출물에서의 성분 분석이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

비장은 면역 반응을 조절하는 가장 핵심적인 신체 조직으로 B 림프구와 T 림프구의 성장과 분화가 일어나는 기관이다(Elmore, 2006). 따라서 이들의 세포증식 및 비장 크기의 변화는 면역력을 분석하는 매우 중요한 지표이다(Drazen et al., 2001; Monmai et al., 2018). 면역억제제로 사용된 CPA는 자가면역 또는 면역 매개 질환을 치료하기 위해 임상적으로 40년 이상 사용함으로써 면역억제제로 입증된 알킬화제로, 실험동물에 면역을 억제하기 위한 용도로 널리 사용되고 있다(Ahlmann and Hempel, 2016; Kim et al., 2022). 본 연구에서는 CPA로 면역을 억제된 실험동물에 모무늬돌김 열수 추출물을 경구 투여한 결과, mitogen이 있고 없는 조건 상관없이 비장세포의 증식이 유의적으로 증가하였다. ConA와 LPS는 비장세포의 유사 분열 인자로 사용되었으며, ConA는 T 림프구의 성장을 유도하고 LPS는 B 림프구의 성장을 유도한다(Omara et al., 1997). 따라서 모무늬돌김 열수 추출물은 T 림프구와 B 림프구 모두의 증식을 유도하여 체액 면역과 세포 면역 모두 관여함으로써 면역을 조절한다는 것을 시사한다.

본 연구 결과는 다른 육상 또는 해조류를 이용한 다양한 천연 추출물들의 면역 증진 연구 결과와 일치하는 것으로, 안토시아닌과 후코이단 이온결합으로 이뤄진 nanocomplex는

RAW264.7 세포와 CPA에 의해 면역이 억제된 실험동물의 혈장에서 NO, iNOS, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, 및 TNF- α 의 발현 증가를 통해 면역 증진 효과를 보고하였다(Han et al., 2021). 그러나, 모무늬돌김의 기능성 소재로서의 활용을 위해 다양한 기능성에 관한 과학적 연구뿐만 아니라, 유효성분에 대한 연구가 충분히 이루어져야 한다고 사료된다.

사 사

이 논문은 2021년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(20210656, 빅데이터기반 해양바이러스 제어 및 마린바이오닉스 개발).

References

- Ahlmann M and Hempel G. 2016. The effect of cyclophosphamide on the immune system: Implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 78, 661-671. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3152-1>.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiurin MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nagues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G and Zitvogel L. 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13, 1050-1059. <https://doi.org/10.1038/nm1622>.
- Atri C, Guefali FZ and Laouini D. 2018. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci* 19, 1801. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.
- Baek SY, Kim SJ, Kim DH and Kim MR. 2019. Comparison of quality characteristics and antioxidant activities between *Porphyra yezoensis* and *Porphyra dentata* in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48, 1233-1243. <http://doi.org/10.3746/jkfn.2019.48.11.1233>.
- Cho BM, Lee YJ, Park JW, Park IB, Cho JY and Moon JH. 2021. Constituents and antioxidant activities of lavers (*Pyropia* spp.) bred at the southwestern coastal area of Korea. *Kor J Food Sci Technol* 53, 669-681. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2021.53.6.669>.
- Choi CW, Yoon HJ, Kim JY, Cho AR, Yim SJ, Shin JW, Choi SJ, Sung RS, Oh BJ, Kim HK and Jung JC. 2019. Pharmaceutical composition *Porphyra dentata* Kjellman extract for skin regeneration. KR patent 10-1981428, Korean Intellectual Property Office, Daejeon, Korea.
- Cooper MD and Alder MN. 2006. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124, 815-822. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>.
- Drazen DL, Bilu D, Bilbo SD and Nelson RJ. 2001. Melato-

- nin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R1476-1482. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.5.R1476>.
- Elmore SA. 2006. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol* 34, 648-655. <https://doi.org/10.1080/01926230600865523>.
- Gourbal B, Pinaud S, Beckers GJM, Van Der Meer JWM, Conrath U and Netea MG. 2018. Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunol Rev* 283, 21-40. <http://doi.org/10.1111/imr.12647>.
- Han NR, Kim HJ, Lee JS, Kim HY, Moon PD, Kim HM and Jeong HJ. 2021. The immune-enhancing effect of anthocyanin-fucoidan nanocomplex in RAW264.7 macrophages and cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *J Food Biochem* 45, e13631. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13631>.
- Hirayama D, Iida T and Nakase H. 2017. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *Int J Mol Sci* 19, 92. <http://doi.org/10.3390/ijms19010092>.
- Hossain A, Dave D and Shahidi F. 2023. Sulfated polysaccharides in sea cucumbers and their biological properties: A review. *Int J Biol Macromol* 253, 127329. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127329>.
- Jang GE, Park BR, Lee SA and Kim CS. 2023. Immune enhancing effects of *Pyropia yezoensis* hydrothermal extract in RAW264.7 cells. *J Mar Biosci Biotechnol* 15, 33-40. <http://doi.org/10.15433/ksmb.2023.15.2.033>.
- Kahn AA, Manzoor KN, Sultan A, Saeed M, Rafique M, Nounshad S, Talib A, Rentschler S and Deigner HP. 2021. Pulling the brakes on fast and furious multiple drug-resistant (MDR) bacteria. *Int J Mol Sci* 22, 859. <http://doi.org/10.3390/ijms22020859>.
- Khatua S, Simal-Gandara J and Acharya K. 2022. Understanding immune-modulatory efficacy in vitro. *Chem Bio Interact* 352, 109776. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109776>.
- Kim HI, Kim DS, Jung Y, Sung NY, Kim M, Han IJ, Nho EY, Hong JH, Lee JK, Boo M, Kim HL, Baik S, Jung KO, Lee S, Kim CS and Park J. 2022. Immune-enhancing effect of *Sargassum horneri* on cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice and primary cultured splenocytes. *Molecules* 27, 8253. <https://doi.org/10.3390/molecules27238253>.
- Kim JH and Park EJ. 2023. Laver production regions recorded in the official geography books of the Joseon dynasty. *J Kor Sor Fish Mar Edu* 35, 150-160. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2023.2.35.1.150>.
- Liu Z, Gao T, Yang Y, Meng F, Zhan F, Jiang Q and Sun X. 2019. Anti-cancer activity of porphyran and carrageenan from red seaweeds. *Molecules* 24, 4286. <https://doi.org/10.3390/molecules24234286>.
- Luo M, Shao B, Nie W, Wei X-W, Li YL, Wang BL, He ZY, Liang X, Ye TH and Wei YQ. 2015. Antitumor and adjuvant activity of λ -carrageenan by stimulating immune response in cancer immunotherapy. *Sci Rep* 5, 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep11062>.
- Mansila MJ, Costa C, Eixarch H, Tepavcevic V, Castillo M, Martin R, Lubetzki C, Aigrot MS, Montalben X and Espejo C. 2014. Hsp70 regulates immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 9, e105737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105737>.
- Martinez FO. 2014. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol* 11, 33-39. <http://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A and Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453-461. <http://doi.org/10.2741/2692>.
- Monmai C, Go SH, Shin IS, You SG, Lee H, Kang SB and Park WJ. 2018. Immune-enhancement and anti-inflammatory activities of fatty acids extracted from *Halocynthia aurantium* tunic in RAW264.7 cells. *Mar Drugs* 16, 309. <https://doi.org/10.3390/md16090309>.
- Monmai C, Kim JS and Baek SH. 2022. Transgenic rice seed extracts exert immunomodulatory effects by modulating immune-related biomarkers in RAW264.7 macrophage cells. *Nutrients* 14, 4143. <http://doi.org/10.3390/nu14194143>.
- Omara FO, Blakley BR, Bernier J and Fournier M. 1997. Immunomodulatory and protective effects of N-acetylcysteine in mitogen-activated murine splenocytes in vitro. *Toxicology* 116, 219-226. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(96\)03520-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(96)03520-2).
- Park HS, Jeong WJ, Kim EC, Jung Y, Lim JM, Hwang MS, Park EJ, Ha DS and Choi DW. 2012. Heat shock protein gene family of the *Porphyra seriata* and enhancement of heat stress tolerance by *PsHSP70* in *Chlamydomonas*. *Mar Biotechnol* 14, 332-342. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9417-0>.
- Park WM, Kang DS and Bae TJ. 2014. Studies on organic acid, vitamin and free sugar contents of commercial dried lavers (*Porphyra yezoensis*) cultivated in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43, 172-177. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.1.172>.
- Pezzanite LM, Chow L, Johnson V, Griffenhagen GM, Goodrich L and Dow S. 2021. Toll-like receptor activation of equine mesenchymal stromal cells to enhance antibacterial activity and immunomodulatory cytokine secretion. *Vet Surg* 50, 858-871. <http://doi.org/10.1111/vsu.13628>.
- Song JH, Kang HB, Park SH, Jeong JH, Park J, You Y, Lee YH, Lee J, Kim E, Choi KC and Jun W. 2017. Extracts of *Porphyra tenera* (Nori seaweed) activate the immune response in mouse RAW264.7 macrophages via NF- κ B signaling. *J Med Food* 20, 1152-1159. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.4014>.
- Sudeep HV, Gouthamchandra K, Ramanaiah I, Raj A, Naveen P

- and Shyamprasad K. 2023. A standardized extract of *Echinacea purpurea* containing higher chicoric acid content enhances immune function in murine macrophages and cyclophosphamide-induced immunosuppression mice. Pharm Bio 161, 1211-1221. <http://doi.org/10.1080/13880209.2023.2244000>.
- Yatim KM and Lakkis FG. 2015. A brief journey through the immune system. Clin J Am Soc Nephrol 10,1274-1281. <http://doi.org/10.2215/CJN.10031014>.
- Yu Y, Shen M, Song Q and Xie J. 2018. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. Carbohydr Polym 183, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.009>.