

**양극해 해양생물 유래물질 면역조절
활성 연구**

Immunomodulatory activities of biological extracts from
bi-polar ocean



성균관대학교 산학협력단
(위탁연구 책임자 : 표 석 능)

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “양극해 미래자원 탐사 및 활용기술 개발” 과제의 위탁연구 “양극해 해양생물 유래물질 면역조절 활성 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



총괄연구책임자	: 임 정 한
위탁연구기관명	: 성균관대학교 산학협력단
위탁연구책임자	: 표 석 능
위탁참여연구원	: 이 경 란
“	: 권 이 슬

요 약 문

I. 제 목

양극해 해양생물 유래물질 면역조절 활성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

면역계는 외부병원체와 암으로부터 인지하고 방어하는 기능을 통해서 생명을 보호하는 정교하게 조절되는 방어체계이다. 이러한 면역계의 특징은 우리 몸속에 침투하여 자생할 수 있는 각종 암에 대한 방어를 담당하고, 죽거나 더 이상 불필요한 세포를 제거하는 역할도 담당하고 있다.

면역조절물질에 관한 연구의 궁극적인 응용 목표중의 하나는 기존의 약물로는 치료가 어려운 질병, 특히 바이러스 감염이나 암에 대한 치료제 또는 치료보조제를 개발하는 것이다. 면역조절물질은 우리가 갖고 있는 생체 방어능을 조절하였다는 점에서 다른 치료법과 근본적으로 구별된다. 즉, 암을 치료할 목적으로 현재 임상적으로 사용되고 있는 항암성 화학요법제의 대부분은 골수세포와 같이 활발하게 분열하는 세포에 대한 세포독성과 같은 근원적 부작용을 갖고 있는 반면, 면역조절물질은 자신이 갖고 있는 생체 방어능의 조절을 통하여 질병을 치료하는 것으로 골수세포에 대한 독성과 같은 근원적인 부작용이 없는 치료제로 개발될 수 있는 가능성을 갖고 있다. 뿐만 아니라, 대부분의 암환자는 면역기능이 저하되어 있는 사실은 암을 효과적으로 치료하기 위해서는 저하된 면역기능을 회복시켜 줄 수 있는 면역조절물질을 연구 개발하여 치료에 응용하는 것이 효과적일 것임을 보여 준다.

면역조절물질에 대한 연구의 또 다른 중요한 목표는 필요 이상으로 과다하게 일어나 오히려 우리에게 해를 끼치는 면역반응을 억제시키는 것이다. 면역반응은 생체방어에 필수적이면서도, 어떤 경우에는 오히려 우리 몸에 손상을 준다. 예를 들면, 염증반응, 과민반응, 알러지반응, 자가면역반응 등이다. 면역반응을 조절하는 물질은 그 효능에 따라서 면역증강제, 면역억제제, 면역회복제 등으로 크게 나누며, 이들을 총칭하여 면역조절제라 부른다.

현재 세계 의약품 산업은 꾸준히 성장하고 있으며 미국은 지속적으로 높은 성장세를 나타내었으며 유럽과 아시아 역시 높은 성장률을 기록하였다. 이 중 면역조절제의 기술개발동향을 살펴보면, 특히 새로운 사이토카인의 발견과 기능규명, 면역억제제, 백신의 개발이 두드러진다. 세계적인 제약회사들은 면역억제효과를 가지는 치료용 항체의 실용화에 박차를 가하고 있으며, 현재 알려져 있는 약들의 적용확대를 위한 연구들이 많이 이루어지고 있는데, 예방백신, 치료백신에 대하여는 난치성 질환 중에서도 AIDS와 암이 치료용 백신의 주요연구대상 질환이며, 최근에는 알러지, 천식,

당뇨병, 알츠하이머, 비만 등 삶의 질과 관련된 다양한 질환에의 적용도 기대되며 분자생물학과 인체면역학의 빠른 발전에 따라 좀더 효과적이고 안전한 백신개발이 가능해지고 있다.

남극해는 대기과 해양 사이의 열 교환과 해빙의 형성에 의해 표층수가 가라앉아 저층수가 형성되는 지역이고, 이는 대서양, 태평양, 인도양으로 퍼져나가기 때문에 전 세계 해양의 해류 순환에 중요한 역할을 하였다. 또한 최근 급속하게 일어나는 북극해 해빙 현상으로 북극해의 산업적 이용에 대한 관심이 증가하고 있다. 남극해 및 북극해를 잘 이용하기 위해서는 과학적 연구가 선행되어야 하는데 기존의 육상동물 기원물질에 대한 연구에 비하면 선진국에서도 매우 제한적으로 연구가 이루어지고 있어 극지생물의 무한한 자원의 중요성을 각국 연구자들이 인식하여 앞으로 활발한 연구가 이루어지게 될 것이라 생각된다. 이렇게 극지생물에서 기원한 물질을 이용하여 면역조절물질, 항비만, 항동맥경화 물질로써의 개발과 그에 대한 특성 및 작용기전을 연구하는 것은 미래의 신약개발에 큰 영향을 미칠 것이라 판단된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 평활근세포(MOVAS-1)에서 양극해 해양생물 유래 물질인 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 세포부착 물질 억제 확인
2. 평활근세포(MOVAS-1)에서 양극해 해양생물 유래 물질인 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin에 의한 세포부착물질 생성억제 및 작용기전 확인
3. 지방전구세포(preadipocyte)에서 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 항비만 효과 측정 및 분자면역학적 기전연구

IV. 연구개발결과

본 연구에서는 실험실에서 확립하고 진행하고 있는 in vitro system을 이용하여 양극해 생물 유래 물질인 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin이 평활근세포의 세포부착물질 억제 및 지방전구세포의 지방분화 억제에 미치는 영향을 확인하였다.

- 평활근 세포주인 MOVAS-1에서 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin이 세포부착물질의 하나인 VCAM-1의 발현을 억제하는 것을 확인하여 동맥경화 치료제로서의 개발 가능성을 제시하였다. 또한 이를 바탕으로 Lobaric acid와 Lobastin에서 세포부착물질 생성억제에 있어서 분자면역학적 작용기전을 확인하였다.
- 지방전구세포주인 3T3-L1 preadipocyte에서 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin 모두 지방세포 분화 억제에는 효과가 없음을 확인하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

양극해 해양물질 유래 성분에서 발굴되는 유효 물질에 대한 면역반응 조절효과와 그 작용기전에 관한 본 연구결과는 세포내의 작용 기전을 구체적으로 제시하고 있다. 이러한 연구 결과를 기초 자료로 활용하여 in vivo의 동물임상 연구가 진행된다

면 인체에 적용할 수 있는 유용한 성분으로 빠르게 개발될 수 있을 것이다. 특히 본 연구에서는 지금까지 효능 연구에 그쳤던 생리활성소재를 찾는 천연자원의 연구들과는 달리 세포 및 분자생물학적 수준에서의 작용 기전이 규명되고 극지 해양생물 유래 성분의 효능이 과학적이고 정확하게 검증됨으로써 이러한 작용 기전을 이용하여 만성 질환 치료 및 예방에 구체적으로 적용할 가능성이 매우 커 극지 산물을 이용한 신약개발에 중요한 정보를 제공할 수 있으리라 사료된다. 또한, 1차적 면역방어기전에서 대식세포의 역할은 매우 중요하고 다양함으로 대식세포의 활성을 조절할 수 있는 해양 생물 유래 성분은 생물학적 반응 조절 가능성을 부여하는 면역조절제 등의 개발에 활용될 수 있다.



S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

Our results demonstrate that lobaric acid, lobarin and lobastin significantly attenuated TNF- α - induced expression of VCAM-1 in vascular smooth muscle cells. However, extracts from bi-polar biological resources had no significant effect on the inhibition of lipid accumulation and adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells.

Taken together, the present data indicate that extracts from bi-polar biological resources such as lobaric acid, lobarin and lobastin have anti-atherosclerotic effect. These new finding might provide a new therapeutic strategy for treating pathological diseases.



C O N T E N T S

(영 문 목 차)

1. Introduction	7
2. Trends in research	9
3. Results	11
4. Achievement of study and contribution of results to science ..	32
5. Perspective on the use of results	33
6. References	34



목 차

제 1 장 서론	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	9
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	11
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	32
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	33
제 6 장 참고문헌	34



제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

WTO 체제의 출범으로 지적 및 산업소유권 강화로 기술의 배타적 권리를 점차 엄격하게 보호하는 방향으로 전개됨으로써 천연물로부터 부가가치가 높은 새로운 물질을 탐색하고 그 물질의 응용에 대하여 독자적인 기술 영역을 구축할 필요가 있다. 또한 기초식품과 의약품의 자체 공급능력 및 수산업 종사 국민들의 생존권 보호를 위해서 식품 또는 의약품의 자원으로써의 고부가가치 해양자원의 생산이 가능하도록 과학적인 신물질 창출연구가 필요하다.

모든 질환은 질병을 공격하는 인자와 방어하는 인자의 불균형으로 인해 유발되며 최근 분자생물학적인 발달로 인해 인체 내의 특이적 면역반응과 복잡하게 연결 되어 있는 신호 체계들이 밝혀져 있다. 이에 따라 치료제 개발에 있어서도 신체 방어의 중요한 역할을 수행하는 면역계에 초점이 맞추어 지고 있다. 면역계는 매우 다양한 기능의 세포들로 구성되어 있어 다양한 시험법들이 활용되고 있으며 특정기능의 면역세포에 대한 작용 기전을 세포 및 분자 수준에서 판단하기 위해 *in vitro* 시험법들이 신물질 탐색에 매우 다양하게 응용되고 있다. 면역조절제의 탐색은 기존의 화학적 합성 또는 육상 동식물에서, 미생물 및 해양생명체로 그 범위가 확대되고 있다. 특히 해양생명체를 기원으로 하는 면역조절제의 탐색은 아직도 기존의 육상동식물 기원물질에 대한 연구에 비하면 선진국에서도 매우 제한적으로 연구가 이루어지고 있어 해양의 무한한 자원의 중요성을 각국 연구자들이 인식하여 앞으로 활발한 연구가 이루어지게 될 것으로 예측된다.

면역 증강제는 병원체에 대한 방어기능을 증가시키거나 면역기능의 상승을 통해 항암작용 및 항바이러스 작용을 증가시킨다. 또한 암세포의 성장과 변형을 감소시키거나 변형된 암세포에 대한 면역기능을 증가시킨다. 이와 반대로 장기이식 시 면역반응에 관여하는 세포들의 증식을 억제하여 면역억제 기능을 나타내는 면역억제제가 있다. 특히 면역억제제 개발의 경우 선진국에서 관심을 가지고 있는 분야로, 이전에는 불가능하게 여겨져 왔던 장기이식을 가능하게 하는 혁명적인 의료기술을 가지고 왔다. 이들 중 가장 널리 사용되고 있거나 혹은 임상 시험중인 약물로는 cyclosporin A, FK-506, rapamycin 등이 있으며 이들은 모두 진균류(fungi)에서 기원하고 있는 약물로 천연물에서 면역조절제를 도출하는 것이 얼마나 중요한 것인가를 보여주고 있다.

면역조절제의 시장성도 매우 큰 것으로 판단되어 면역억제제인 cyclosporin A만 보더라도 1994년도 현재 전 세계적으로 약 10억불 규모의 시장이 형성되어, 그 제한적인 사용범위를 생각하면 면역억제제 시장이 매우 크다고 판단된다. 다양하게 응용되는 면역조절물질의 생물학

적 특성 및 작용기전을 연구하는 것은 효율적인 생체 반응조절제로서 새로운 면역조절제의 개발에 도움을 줄 것이라 생각된다.

제 2 절 연구개발의 범위

본 연구에서는 양극해 생물 유래 물질인 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin을 이용하여 평활근 세포인 MOVAS-1 세포에서 세포부착 물질 억제 효과를 규명하였고, 이를 바탕으로 세포부착 물질 억제에 작용하는 작용기전을 확인하였다. 또한 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin 물질의 비만억제 효과를 확인하기 위하여 지방전구세포인 preadipocyte에서 확인하였다. Lobaric acid, Lobarin, Lobastin이 비만억제에는 효과가 없음을 확인하였다. 이를 통하여 본 연구 물질인 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin이 동맥경화 치료제로서의 가능성을 확인하였다.

1. 양극해 해양생물 유래 물질의 세포부착물질 억제효과 측정
2. 양극해 해양생물 유래 물질의 세포부착물질 억제에 작용하는 작용기전 연구
3. 양극해 해양생물 유래 물질의 지방전구세포 지방분화 억제효과 측정

극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

면역 작용의 조절은 암, 자가 면역 등 다양한 질병에 이용 될 수 있기 때문에 오래 전부터 면역 작용을 증강시키기 위하여 많은 물질들을 사용해 왔다. 최근에는 많은 유전 공학 기술의 발달, 대량 세포 배양, 단백질과 DNA 서열 분석을 통한 많은 기술의 발달로 인하여 면역 조절제에 대한 관심이 높아지고 있다. 새로운 기술 개발등으로 인하여 interferon, interleukin, tumor necrosis factor와 growth factor 등을 포함한 순도 높은 면역 조절제의 대량 생산이 가능하게 됨에 따라 면역 조절 작용 물질에 대한 연구가 빠르게 진행되고 있다. 또한 천연물로부터 기원하는 새로운 면역조절제의 발굴 연구가 활발하게 진행되고 있다.

요즘 사용되고 있는 면역조절제는 cytokines, 미생물에서 유래된 물질. 화학적으로 합성된 물질이 있으며 이 중 미생물에서 유래된 BCG, Picibabil, krestin, lentinan, bBiostim, Broncho-Vaxom등은 임상적으로 만성감염 및 gastric cancer에 사용되고 있다. Thymus에서 유래된 thymostimulin, T-activin과 thymomodulin은 암 치료에 이용되고 있으며, 화학적으로 합성된 MDP 유도체인 murabutide, peptide 계통인 thymosin α , tuftsin, thymomimetic drug인 ditiocarb, interferon 생성물질인 ampligen 등은 각각 HIV 감염과 암 치료에 이용되고 있다. 그 이외에 cyclosporin 과 FK506은 장기 이식에 필요한 면역 억제제 작용을 가지고 있다. corticosteroid, momsteroidal antiinflammatory agent, morphine, marijuana와 antibiotic 등도 면역조절작용이 있다고 보고 되고 있다.

미국 및 유럽국가를 중심으로 한 선진국에서 단일클론항체 생산기술, DNA 재조합기술, 대량세포 배양기술, 단백질합성기술 등 생명공학기술이 발전하여 면역조절제에 대한 관심이 높아지고 있으며, 새로운 기술을 이용한 여러 가지 면역조절제의 개발이 계속적으로 이루어지고 있다. 실제로 유전자 재조합기술을 이용하여 다양한 사이토카인 물질(TNF, 인터페론, 인터루킨, TGF 등)이 순도 높게 대량 생산되었고, 미생물의 병원성만을 제거한 백신이 개발되었으며, 세포배양기술 및 단백질 합성기술의 발전이 새로운 면역 조절제 개발에 박차를 가하고 있다. 인터페론, 인터루킨, 케모카인, EPO, G-CSF 등의 사이토카인류가 사업화된 대표적인 면역조절제이며, 미생물에서 유래된 다당체가 면역을 증강시키기 위한 보조제로 이용되고 있고, 사이클로스포린 A, FK506, 아자티오푸린 및 스테로이드 물질은 실험실에서 합성되어 장기를 이식한 환자들에게 면역억제제로 사용되고 있다. 그 밖에 해양자원을 포함한 천연물질로부터 추출한 생리활성물질이 면역조절효과를 가지는 새로운 면역 조절제로서 보고되어 있으며, 이를 이용한 면역증강제 및 건강보조식품이 개발되고 있다.

국내에서는 1980년대 개발된 유전자 재조합기술, 세포배양기술을 토대로 1990년대부터 선진국의 모방제품들이 생산되기 시작하였으며 인터페론, EPO, 사람성장호르몬 등이 그 대

표적인 의약품이라고 할 수 있다. 동아제약 등 국내 제조사에 의해 만들어진 이들 모방제 품들은 물질특허가 인정되지 않는 제 3세계로 수출되어 많은 외화획득을 이룩하고 있다. 현재 국내에서 유전자재조합 과정에서부터 세포배양, 정제, 제제화 등의 전체공정을 수행할 수 있는 곳은 약 10개 내외의 제조소 정도에 불과하며, 전반적인 생명공학 기술의 수준도 선진국의 60%로 크게 열세로, 기반기술은 어느 정도 확보되어 있으나 생산기술의 축적이 필요한 실정이다. 생산기술 중 미생물 개량 및 발효기술은 선진국 수준이나 분리·정제기술 등 생물공정기술이 낙후되어 있고 신물질 탐색이나 개발도니 신물질에 대한 안전성 평가기술 등의 하부 기반기술도 낙후되어 있어 경쟁력 있는 제품이 단시일 내에 생산되기를 기대하기는 어렵다. 그러나 국내 사이토카인의 시장은 매년 11%의 높은 성장률을 보이고 있다. 국내에서 면역증강제의 개발은 매우 활발하다. 화인코가 만든 양질의 베타글루칸(β -glucan)을 함유하는 아가리쿠스 버섯을 이용한 면역증강제 외에 인삼 및 상황버섯 추출 면역다당체(코인텍), 생약성분의 면역증강제 이뮤넷스(씨트리), 강력한 림프구 생성작용이 있는 자생물질 테두리방귀버섯과 비단빛깔대기버섯 등이다. 또한 최근에 일양약품이 항암 효과를 갖고 있는 베타 이뮤난을 개발하였다.



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용

극지 해양생물 성분인 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 면역 조절효과를 측정하기 위하여 본실험에서는 실험실에서 확립한 in vitro 실험방법을 이용하여 면역조절 작용을 확인하였다. 평활근세포에서 세포부착물질 억제, 지방전구세포에서 지방분화 억제효과를 확인하였다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

가. 실험물질

- (1) Lobaric acid
- (2) Lobarin
- (3) Lobastin



나. 세포주

MOVAS-1 : C57B6, aorta, smooth muscle; immortalized with SV40
3T3-L1 : mouse embryonic fibroblast, adipose like cell line

다. 시약

Agarose (SeaKem LE) : Biowhittaker Molecular Applications, USA
Ammonium persulfate : Sigma, Chemical Co., USA
Bovine serum : GibcoBRL, USA
Dexamethasone : Sigma, Chemical Co., USA
Dithiothreitol (DTT) : Sigma, Chemical Co., USA
Dimethylsulfoxide (DMSO) : Sigma, Chemical Co., USA
DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) : Lonza, USA
100 bp DNA ladder marker : Solgent, Korea
d-PBS : Invitrogen, USA

EDTA : Sigma, Chemical Co., USA
Fetal Bovine Serum (FBS) : Lonza, USA
G148 : A.G. Scientific, Inc, USA
RPMI medium 1640 : Gibco, USA
Hybond-ECL membrane : Amersham pharmacia biotech., UK
Isobutylmethylxanthine (IBMX) : Sigma, Chemical Co., USA
Isopropanol : Sigma, Chemical Co., USA
Insulin : Sigma, Chemical Co., USA
Kodak scientific imaging film : Kodak, USA
MTT : Sigma, St Louis, MO, USA
N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED) : Sigma, Chemical Co., USA
NP-40 : Sigma, Chemical Co., USA
Penicillin/streptomycin : Lonza, USA
Protein assay kit : Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Retinoic acid : Sigma, Chemical Co., USA
Skim milk : BD, USA
Sodium dodecylsulfate (SDS) : Sigma, Chemical Co., USA
Trypsin-EDTA : Invitrogen, USA
Tween-20 : Sigma, Chemical Co., USA
Westzol Western Blotting Detection Reagent : INTRON, KOREA

라. 기기

Autoclave : Tuttnauer Co., Israel
Clean bench : Vision Sci. Co., Korea
Microcentrifuge : Sigma Laboratory Centrifuges, Germany
Microplate reader : Molecular device, USA
UV-Visible Spectrophotometer : SHIMADZU, JAPAN
Xcell II™ Blot module : NOVEX, USA

2. 실험방법

가. 세포배양

MOVAS-1은 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (10,000 U pen/mL, 10,000 μ g strep/mL), 200 μ g/ml G418을 포함하는 DMEM 배지(Lonza, USA)에 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하며 배양하였다. 3T3L1은 10% Bovine serum, 1% penicillin-streptomycin (10,000 U pen/mL, 10,000 μ g strep/mL)을 포함하는 DMEM 배지(Lonza, USA)에 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하며 배양하였다. 세포는 세포배양판 (microplate 또는 petridish)에 세포를 분주한 후 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기에서 안정시킨 후 다양한 실험에 이용하였다.

나. 세포 생존도 (Cell viability)

MOVAS-1 세포, 3T3-L1 세포를 96-well plate에 각각 well당 3×10^6 세포로 분주하고 다양한 처리 조건으로 세포를 배양한 후에 세포 생존률을 측정하기 위해서 MTT (2mg/ml)를 25 μ l 첨가한 후 5% 조건에서 4시간동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 150 μ l의 DMSO를 가하여 formazan을 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 비교하였다.

다. 총단백질의 분리 및 정량과 Western blot analysis

세포를 60 mm culture dish와 100mm culture dish 에 plate당 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 세포를 분주하고 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. 배양된 세포를 회수하여 d-PBS를 이용하여 세척하고 세포침전물에 lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.0, 2mM EGTA, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 150mM NaCl, 20mM β -glycerophosphate, 5 ng/ml leupeptin, 0.1 TIU/ml aprotinin) 50~100 μ l 넣고 침전물을 녹인 후에 ice에 30~60분간 방치해 놓은 후에 원심분리 (4°C, 13000 rpm, 10분)하여 상등액을 취해 protein assay kit (BioRad, USA)를 이용하여 단백질의 양을 정량하였다.

실험에 이용할 20~50 μ g의 단백질을 적당한 농도의 SDS-PAGE gel에 전기 영동한 후 Hybond-ECL nitrocellulose membrane으로 overnight transfer하였다 단백질이 옮겨진 membrane은 1시간 동안 상온에서 5% skim milk in TBST (Tris Buffered Saline with Tween; 25 mM Tris, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween-20, pH 8.0)를 blocking buffer로 만들어 처리한 후 primary Ab in blocking buffer를 1시간 동안 상온에서 처리하거나 혹은 4°C에서 12시간이상 처리하였다. TBST로 6회 세척 후 HRP-conjugated secondary Ab in blocking buffer를 1시간 동안 상

온에서 처리하였다. TBST로 6회 세척 후에 detection reagent (ECL)를 가한 후 Kodak scientific imaging film에 노출시켜 각각의 단백질 발현을 확인하였다.

라. Adhesion molecule 측정

MOVAS-1 세포를 계대배양 후 $1-4 \times 10^4$ cells/well의 농도로 희석하여 96 well plate에 분주하고 배양하였다. 12시간 배양 후 양극해 생물 유래 물질을 다양한 농도로 처리한 후 2시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 상등액을 제거하고 d-PBS로 세척한 후 TNF- α (10 ng/ml)를 처리하였다. 8시간 후에 ELISA assay를 이용하여 세포 표면에서 발현되는 세포부착분자들을 측정하였다. 세포 배양 상등액을 제거하고 d-PBS로 2번 세척한 후 blocking buffer (1% FBS in d-PBS) 200 μ l를 넣어 상온에서 30분 non-specific binding시킨다. Washing buffer (0.05% Tween 20 in d-PBS)로 3회 세척하고 primary antibody (ICAM-1(R&D)와 VCAM-1 (R&D))를 blocking buffer에 1:500으로 희석하여 100 μ l씩 첨가하여 상온에서 2시간동안 방치하였다. 그 후 washing buffer로 5회 세척하고 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rat secondary antibody를 blocking buffer에 1:1000배로 희석하여 100 μ l씩 첨가하여 상온에서 1시간 방치 후 washing buffer로 7회 세척하였다. Peroxidase substrate를 100 μ l 첨가하여 차광시키고 30분 동안 상온 배양하였다. microplate reader를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. RT-PCR과 Quantitative Real-Time PCR

RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용하여 VCAM-1의 mRNA 발현량을 측정하였다. 추출된 total RNA는 RevertAidTM H Minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA)를 이용하여 mRNA 발현량을 측정하였다. 먼저 reverse transcription step인 total RNA를 cDNA로 만드는 과정으로 추출한 total RNA를 2~5 μ g과 oligo dT primer 1 μ l, DEPC-treated water를 넣어서 total 10 μ l가 되게 만든 후 65 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 방치하였다. 여기에 5 \times reaction buffer (final 1 \times), 10mM dNTP Mixture 2 μ l, RNase inhibitor (20 units/ μ l) 1 μ l, M-MuLV Reverse Transcriptase (200 units/ μ l) 1 μ l 를 첨가한 후에 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후에 생성된 cDNA mixture 1 μ l를 PCR 반응에 사용하였다. VCAM-1 발현을 확인하기 위한 PCR을 위하여 1 μ l의 DNA와 PCR mixture (dNTP Mixture (final 300 μ M), 10 \times EF taq buffer (final 1 \times), EF taq polymerase (final 2.5 units/100 μ l), PCR

primer, DW)를 혼합하여 총 25 μ l의 반응액을 25~30회 반복하는 PCR cycle로 반응하였다. 이때 각각의 RT-PCR에서 동량의 RAN가 사용되었음을 확인하기 위하여 house keeping gene인 GAPDH를 사용하여 함께 PCR을 진행하였다.

바. 핵 단백질의 분리 및 정량

세포를 100mm culture dish에 plate당 2×10^6 세포로 분주하여 24시간동안 안정화시킨 후 다양한 처리 조건으로 세포를 배양하였다. 핵 추출물을 분리하기 위해 세포를 d-PBS로 세척하고 cell pellet에 buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5mM $MgCl_2$, 10mM KCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0.1% NP-40)를 200 μ l 넣고 ice에서 10분 동안 방치하여 세포막을 파괴하였다. 그 후 원심분리 (1,500 \times g, 4 $^{\circ}C$, 10분)하여 상등액을 취하며 세포질을 정량하였다. Pellet에 200 μ l의 buffer A' (Buffer A without NP-40)를 넣고 현탁하여 다시 원심분리 (1,500 \times g, 4 $^{\circ}C$, 10분) 하였다. 다시 상등액을 제거하고 50 μ l의 buffer C (20mM HEPES pH 7.9, 0.2M NaCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM EDTA, 25% Glycerol, 1mM PMSF)를 넣고 핵으로부터 핵 단백질을 추출하기 위하여 40분 동안 ice에 방치하였으며 매 10분 간격으로 격렬하게 15초 동안 교반하여 주었다. 그 다음 원심분리 (14,000rpm, 4 $^{\circ}C$, 10분)하고 핵 단백질이 포함된 상등액을 취하여 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 핵 추출물을 정량하였다.



사. 세포분화 유도과 Oil red O 염색 및 지방축적 측정

3T3-L1 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 희석시켜 6 well plate에 분주한 후 배양하였다. 배양 2 일 후, 세포가 80% 정도 성장하였을 때, 배지를 분화유도 배지(DMEM, 10% FBS, 1 μ M Dexamethasone, 0.5mM IBMX, 5 μ g/ml로 바꿔준 뒤, Lobaric acid, Lobarin, Lobastin을 농도별로 처리한 후, 37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 조건하에서 2 일간 배양하였다. 그 후, 분화유지 배지(DMEM, 10% FBS, 5 μ g/ml Insulin)로 교체하고 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin을 농도별로 처리하였다. 그 후, 2일 간격으로 분화 유지배지와 시료를 교체하면서 9일 동안 추가적으로 배양하였다.

Lobaric acid, Lobarin, Lobastin이 3T3L1 세포의 분화를 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 지방 전구세포 분화에서 형성되는 중성지방을 특이적으로 염색시키는 Oil red-O 염색법을 이용하였다. 먼저 배양중인 세포에서 배지를 제거하고, 3% paraformaldehyde를 1ml/well씩 넣어 5분간 실온에서 세포를 고정하였다. paraformaldehyde를 제거하고 2ml의 새로운 4% paraformaldehyde를 넣어주었다. 4% paraformaldehyde는 제거하고 60% isopropanol을 이용하여 3회 washing한 후, 각 well이 완전히 마를 때까지 정치하였다. 그 후, 각 well에 Oil red-O working solution(0.5% Oil Red-O in

70% Isopropanol)을 첨가하고 20분간 교반 염색하였다. Oil red-O working solution을 제거하고 즉시 D.W.를 이용하여 4회 세척한 후, 지방이 축적된 세포 사진을 촬영하였다. 그 후 염색된 중성지방의 함량을 확인하기 위하여 100% isopropanol을 가하여 10분간 교반, 중성지방에 침착한 Oil Red-O를 용출시켰다. 용출된 용액은 1.5ml microtube에 옮겨 담고 20℃에서 10,000 × g로 원심분리한 후, 200 μ l의 상층액을 96 well ELISA plate에 옮겨 510nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 지방 축적 정도를 계산하였다.



제 3 절 결과

1. 양극해 생물 유래 물질의 세포부착물질 억제효과 측정

가. 백관 평활근세포에서 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 세포 부착 물질 억제효과 측정

(1) MOVAS-1 세포에서 Lobaric acid의 세포부착물질 억제효과 측정

마우스 백관 평활근세포주인 MOVAS-1 cell에 미치는 Lobaric acid의 세포독성을 알아보기 위하여 Lobaric acid를 24시간 동안 처리하여 배양하였다. MTT assay로 세포의 생존율을 평가하였으며, Lobaric acid를 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 생존율을 백분율로 나타내었다. MOVAS-1 cell에 Lobaric acid를 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml 농도로 처리한 결과, 100 µg/ml을 제외한 Lobaric acid를 처리한 전 구간에서 약 90%의 생존율을 보이는 것을 확인하였다.

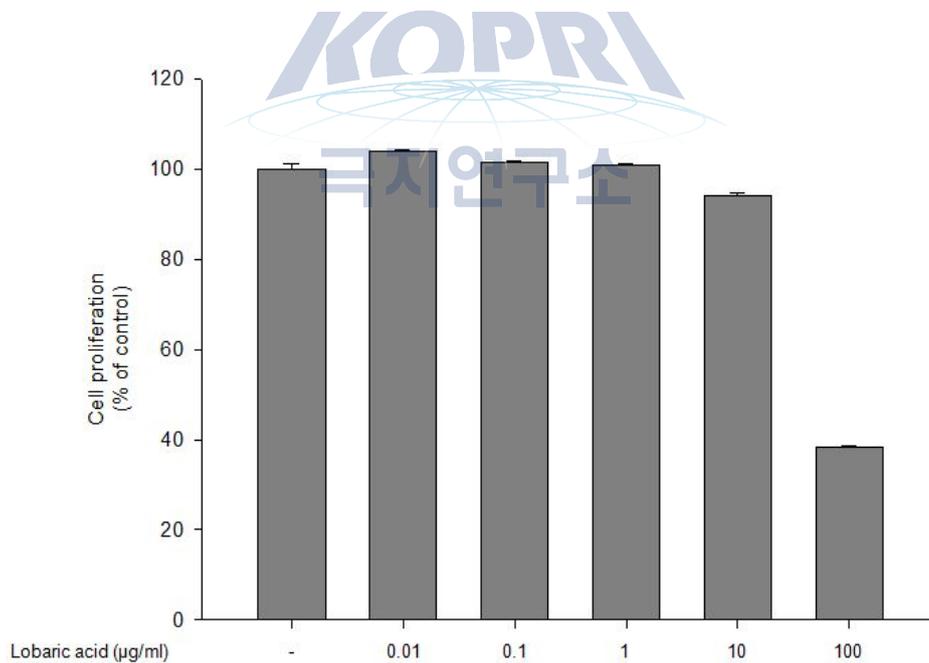


Figure 1. The effect of Lobaric acid on the cell viability in MOVAS-1 cells. MOVAS-1 cells were treated with indicated concentrations of Lobaric acid for 24 hr. Viability was determined by MTT assay.

평활근세포의 세포표면에 존재하는 세포부착분자물질 VCAM-1의 발현에 Lobaric acid가 미치는 영향을 알아보기 위해 Lobaric acid를 0.1, 1, 10 µg/ml의 농도로 2시간 처리한 후

TNF- α (10ng/ml)를 처리하고 8시간 배양하였다. ELISA를 통해 세포 표면의 VCAM-1 발현을 확인한 결과, Lobaric acid에 의해 세포 표면의 VCAM-1 발현이 감소함을 확인하였다.

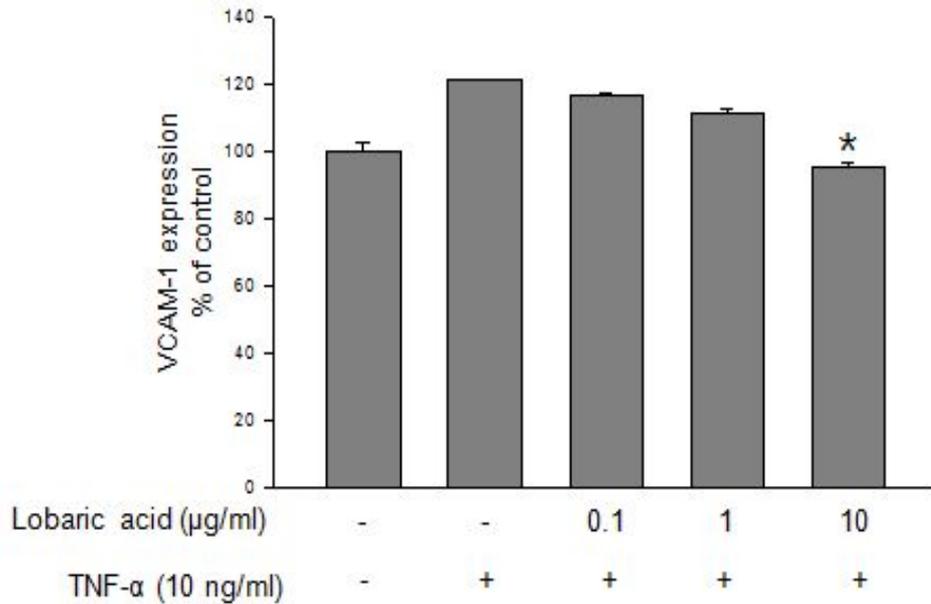


Figure 2. The effect of lobaric acid on VCAM-1 protein expression in MOVAS-1 cells. Cells were pre-treated for 2 hr with indicated concentrations of lobaric acid and then were stimulated by TNF- α (10 ng/ml) for 8 hr. The expression of VCAM-1 on cell surface was determined with ELISA.

평활근세포의 세포내에서 발현하는 VCAM-1이 lobaric acid에 의해 어떤 영향을 받는지 알아보기 위해 lobaric acid를 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 2시간 배양 후 상등액을 버리고 세척한 후 TNF- α (10ng/ml)를 처리하고 8시간동안 배양하였다. Western analysis를 통해 VCAM-1의 단백질 발현을 확인한 결과, lobaric acid에 의해 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.

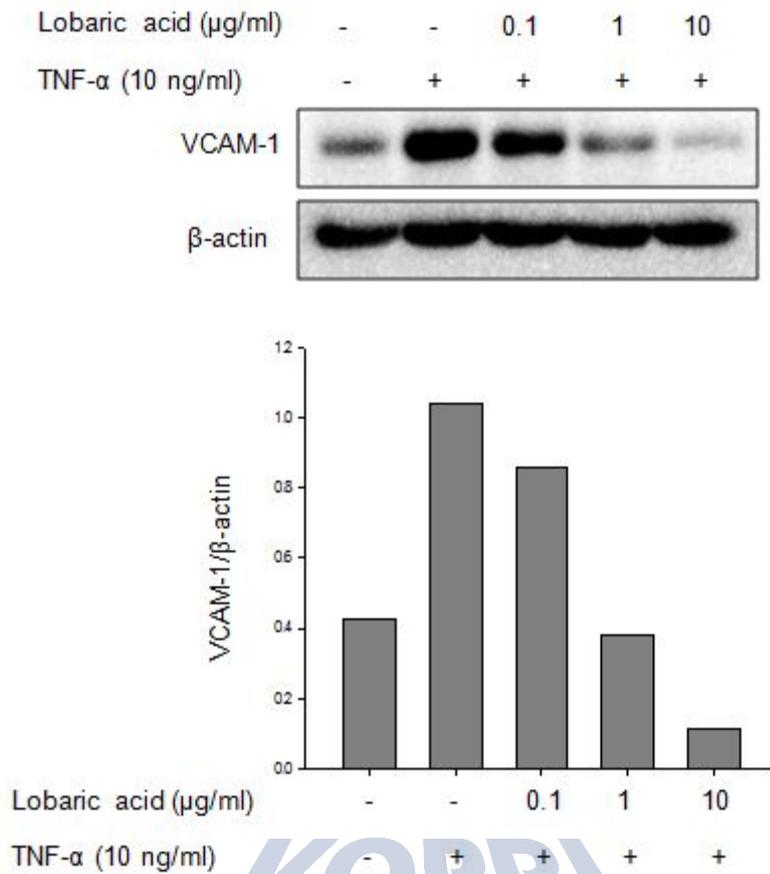


Figure 3. The effect of Lobaric acid on VCAM-1 protein expression in MOVAS-1 cells. Cells were pre-treated for 2 hr with indicated concentrations of lobaric acid and then were stimulated by TNF- α (10 ng/ml) for 8 hr. Total cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies for VCAM-1 and β -actin, respectively.

MOVAS-1 세포에서 VCAM-1이 Lobaric acid에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 VCAM-1의 단백질 발현을 ELISA를 통하여 재확인하였고, VCAM-1의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통하여 확인하였다. MOVAS-1 cell에 Lobaric acid를 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 결과, Lobaric acid의 농도가 증가 할수록 VCAM-1의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

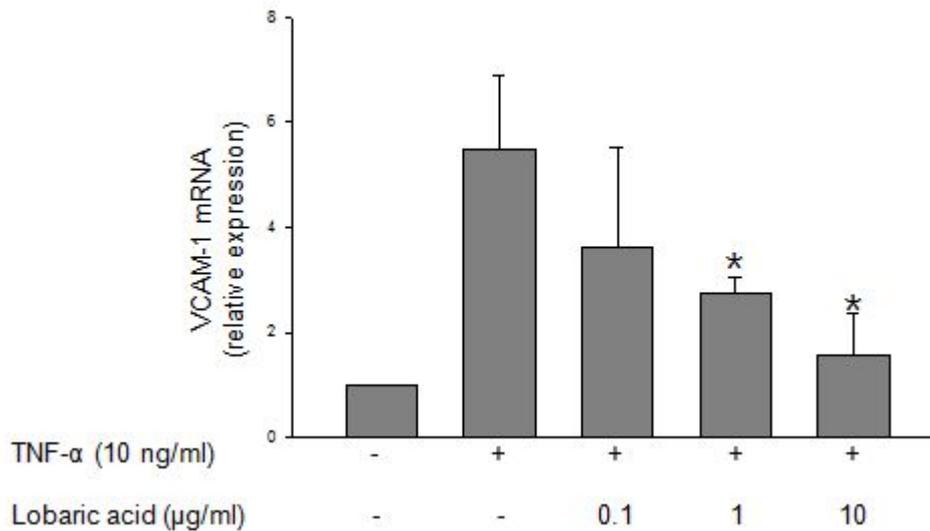
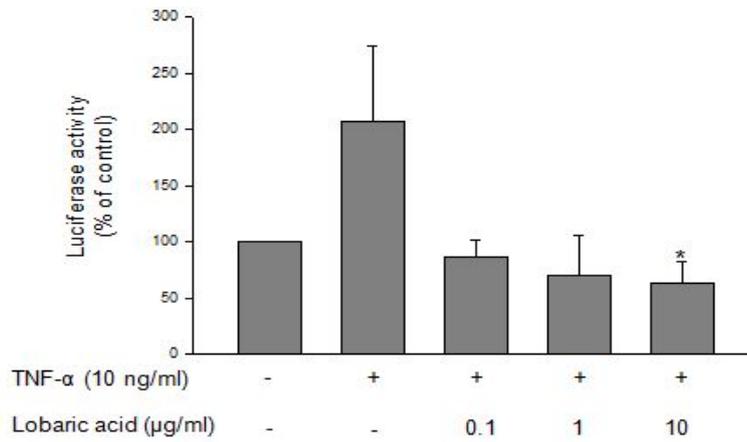


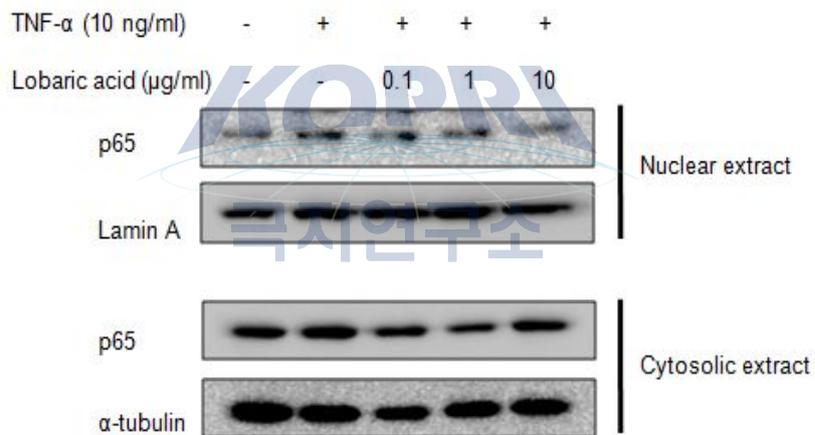
Figure 4. TNF- α -induced vascular cell adhesion molecule expression was inhibited by Lobaric acid. Expression of VCAM-1. The data are expressed as a percentage of TNF- α -induced adhesion molecule expression. Levels of the mRNA for adhesion molecules were determined by real time-PCR. GAPDH served as a housekeeping gene. The results illustrated are from a single experiment, and are representative of three separate experiments. Expression of VCAM-1 mRNA is in arbitrary units, and data are normalized to respective amount of GAPDH mRNA. Data are expressed as the mean \pm S.E.M of three experiments. * Significantly different from TNF- α -stimulated cells not treated with lobaric acid. (* $p < 0.05$)

MOVAS-1 세포에서 p65가 Lobaric acid에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 p65의 발현을 western blot으로 확인하였고, NF- κ B의 전사 활성을 Luciferase assay를 통하여 확인하였다. MOVAS-1 cell에 Lobaric acid를 0.1, 1, 10 μ g/ml 농도로 처리한 결과, Lobaric acid의 농도가 증가 할수록 p65의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, I κ B α 의 발현이 Lobaric acid를 처리함에 따라 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 NF- κ B의 전사활성 또한 Lobaric acid의 농도가 증가함에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

(A)



(B)



(C)

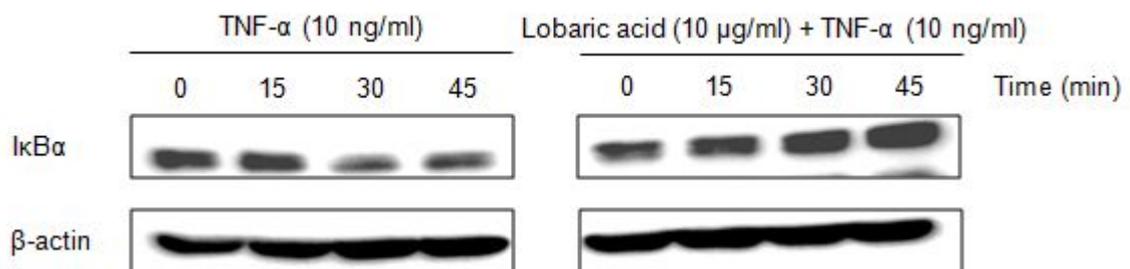
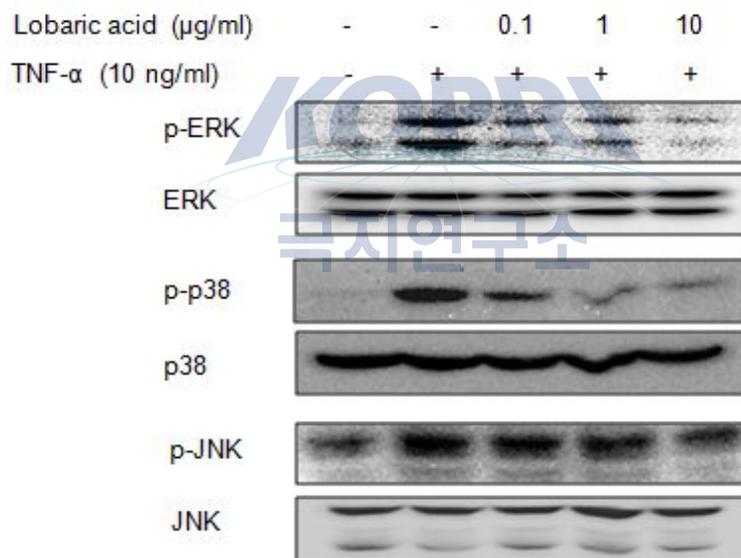


Figure 5. Inhibition of TNF- α -induced activation of NF- κ B and I κ B α degradation by lobaric acid. NE, nuclear extracts; CE, cytoplasmic extracts. (A) VSMCs (MOVAS-1)

were transfected with a pGL3-NF- κ B-Luc repoqRTer plasmid and pCMV- β -gal, pretreated with various concentrations of lobaric acid for 2 h, and stimulated with TNF- α for 4 h. The results are mean \pm S.E.M of 3 experiments. * $p < 0.05$, significantly different from the group treated with TNF- α -induced MOVAS-1ells. (B) and (C) were pre-incubated with or without various concentrations of lobaric acid for 2 h, and then treated with TNF- α for 4 h. The whole cell lysates of MOVAS were analyzed by Western blot with anti-I κ B α antibody. Lamin A and β -actin were used as loading controls for nuclear and cytosolic protein fractions, respectively. The results illustrated are from a single experiment, and are representative of two or three separate experiments.

평활근세포에서 MAP Kinase가 Lobaric acid에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 ERK, JNK, p38의 발현을 western blot으로 확인하였다. ERK, JNK, p38 모두 activity를 가지는 phosphorylated form이 Lobaric acid의 처리에 의해 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



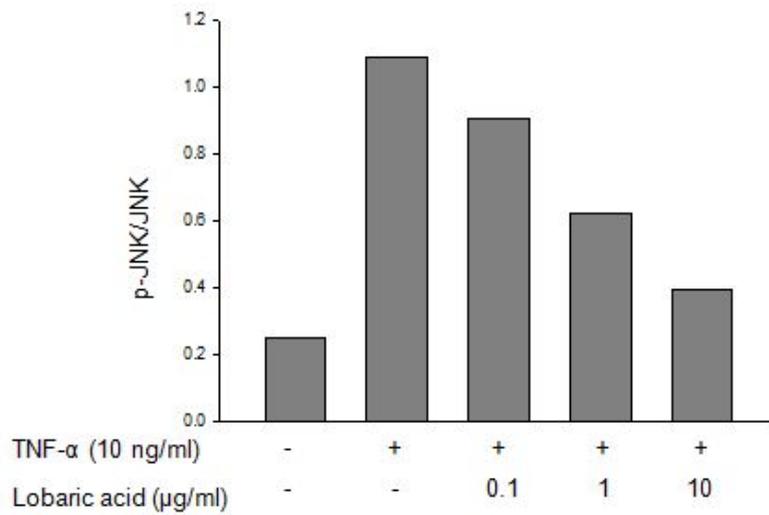
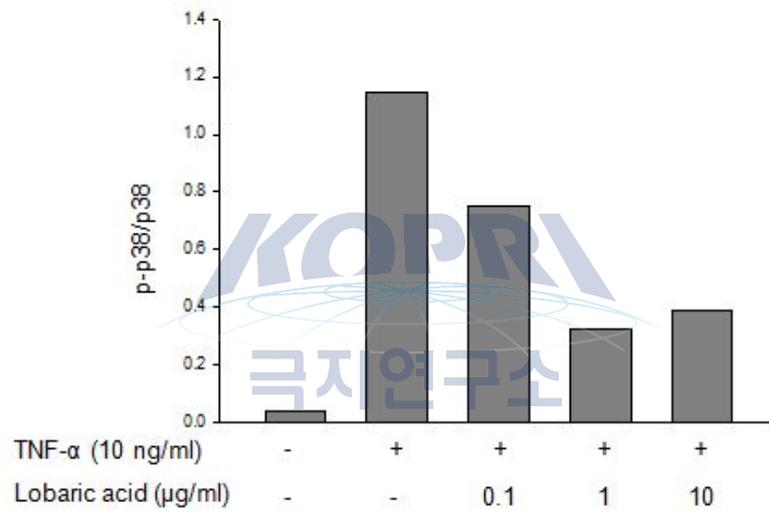
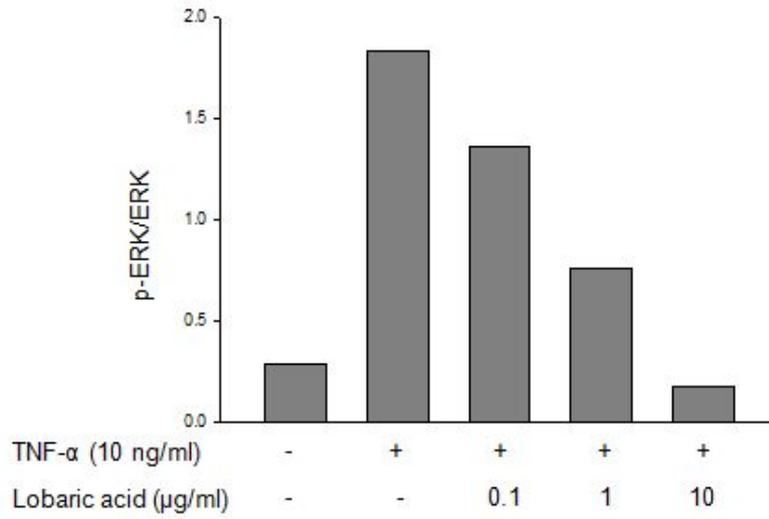


Figure 6. Effect of lobaric acid on MAP kinases in TNF- α -stimulated smooth muscle cells. VSMCs were pretreated with the indicated concentration of lobaric acid for 2 h and then incubated with TNF- α for 15 min. The whole cell lysates were analyzed by Western blot analysis. A typical result from three independent experiments is shown.

평활근세포에서 TNF-R1이 Lobaric acid에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 TNF-R1의 발현을 western blot을 통하여 확인하였다. TNF-R1이 Lobaric acid의 처리에 의해 농도가 증가함에 따라 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

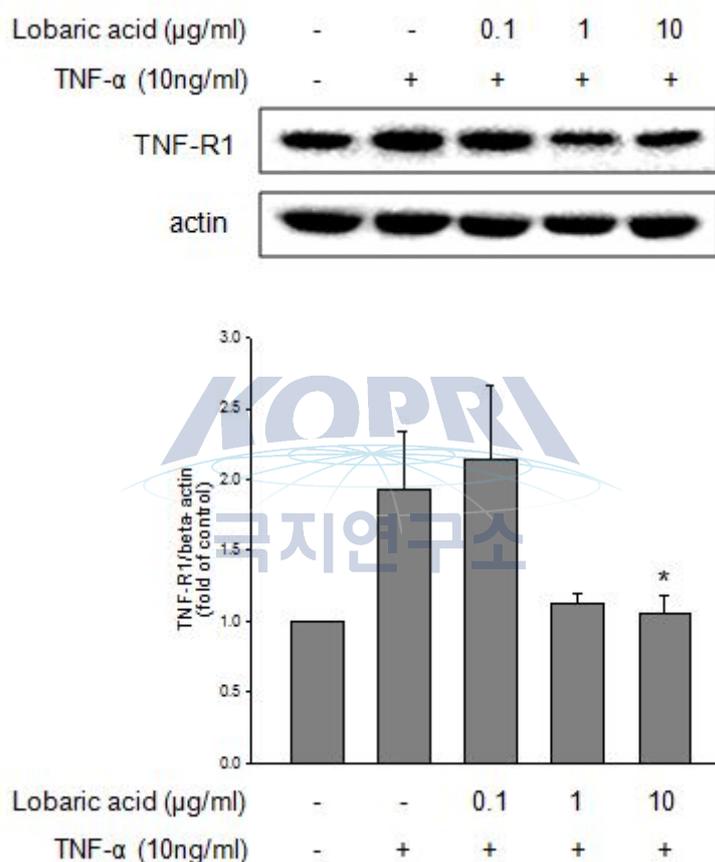


Figure 7. Inhibition of TNF- α -induced expression of TNF- α receptor 1 by lobaric acid. VSMCs were pretreated with the indicated concentration of lobaric acid for 2h and then incubated with TNF- α for 4 hours. The cytoplasmic cell was analyzed by Western blot analysis. The results are mean \pm S.E.M of 3 experiments. * $p < 0.05$, significantly different from the group treated with TNF- α -induced VSMCs cells.

(2) MOVAS-1 세포에서 Lobastin의 세포부착물질 억제효과 측정

마우스 맥관 평활근세포주인 MOVAS-1 cell에 미치는 Lobastin의 세포독성을 알아보기 위하여 Lobastin를 24시간 동안 처리하여 배양하였다. MTT assay로 세포의 생존율을 평가하였으며, Lobastin를 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 생존율을 백분율로 나타내었다. MOVAS-1 cell에 Lobastin를 0.1, 1, 5, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 결과, Lobastin를 처리한 전 구간에서 100%의 생존율을 보이는 것을 확인하였다.

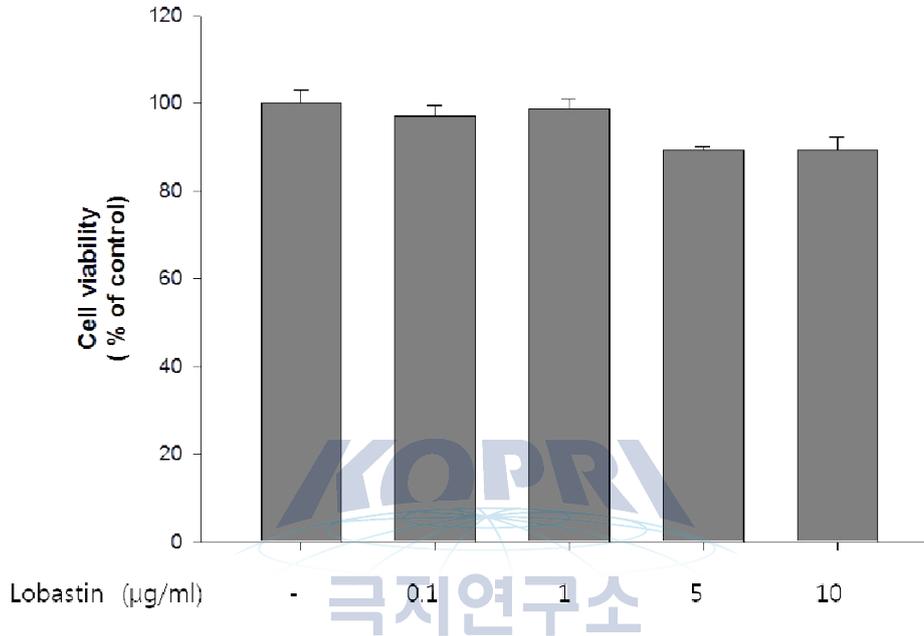


Figure 8. The effect of Lobastin on the cell viability in MOVAS-1 cells. MOVAS-1 cells were treated with indicated concentrations of Lobastin for 24 hr. Viability was determined by MTT assay.

평활근세포의 세포표면에 존재하는 세포부착분자물질 VCAM-1의 발현에 Lobastin이 미치는 영향을 알아보기 위해 Lobastin를 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 2시간 처리한 후 TNF- α (10ng/ml)를 처리하고 8시간 배양하였다. ELISA를 통해 세포 표면의 VCAM-1 발현을 확인한 결과, Lobastin에 의해 VCAM-1의 발현이 감소함을 확인하였다.

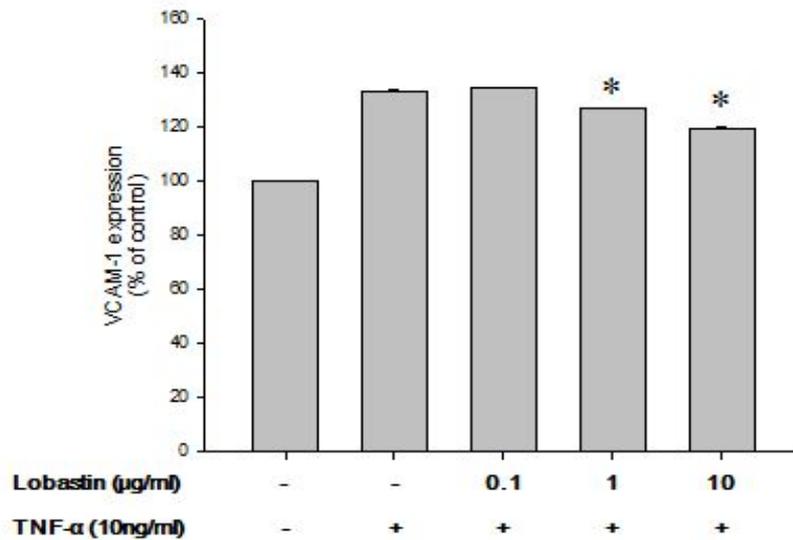


Figure 9. The effect of lobastin on VCAM-1 protein expression in MOVAS-1 cells. Cells were pre-treated for 2 hr with indicated concentrations of lobastin and then were stimulated by TNF- α (10 ng/ml) for 8 hr. The expression of VCAM-1 on cell surface was determined with ELISA.

평활근세포의 세포내에서 발현하는 VCAM-1이 lobastin에 의해 어떤 영향을 받는지 알아보기 위해 lobastin을 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 2시간 배양 후 상등액을 버리고 세척한 후 TNF- α (10ng/ml)를 처리하고 8시간동안 배양하였다. Western analysis를 통해 VCAM-1의 단백질 발현을 확인한 결과, lobastin에 의해 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.

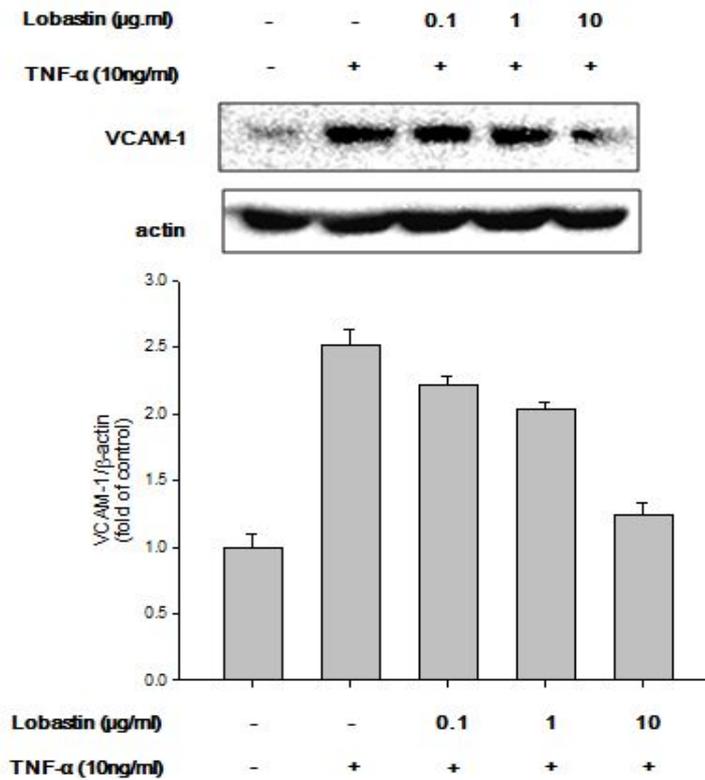


Figure 10. The effect of Lobastin on VCAM-1 protein expression in MOVAS-1 cells. Cells were pre-treated for 2 hr with indicated concentrations of lobastin and then were stimulated by TNF- α (10 ng/ml) for 8 hr. Total cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies for VCAM-1 and β -actin, respectively.

MOVAS-1 세포에서 VCAM-1이 Lobastin에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 VCAM-1의 발현을 ELISA를 통하여 재확인 하였고, VCAM-1의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통하여 확인하였다. MOVAS-1 cell에 Lobastin를 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 결과, Lobastin의 농도가 증가 할수록 VCAM-1의 발현과 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

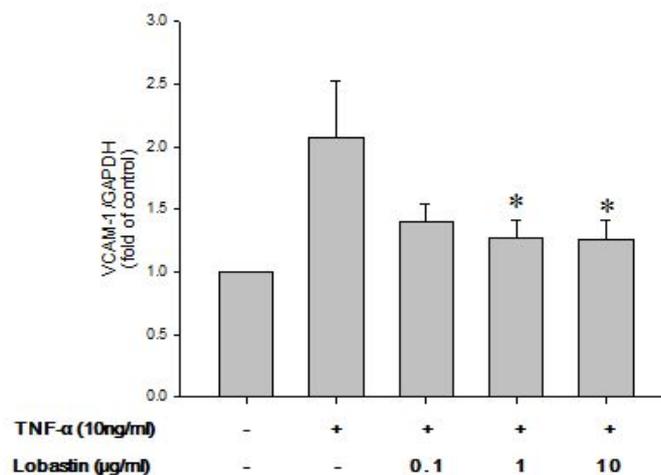
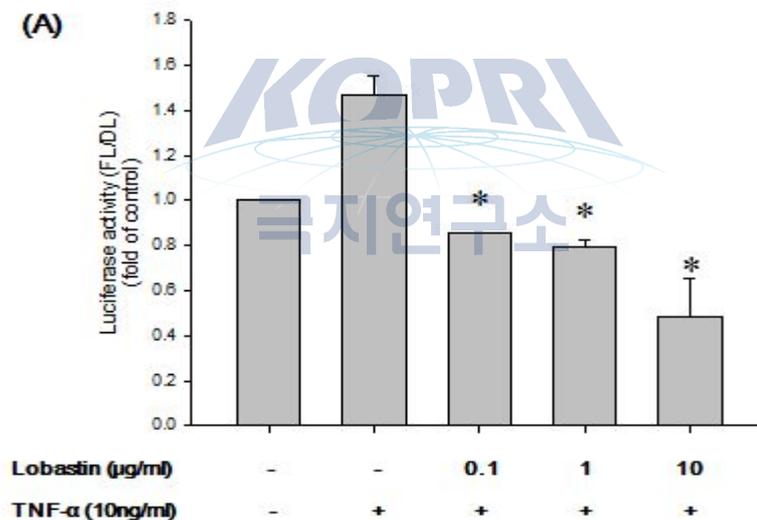


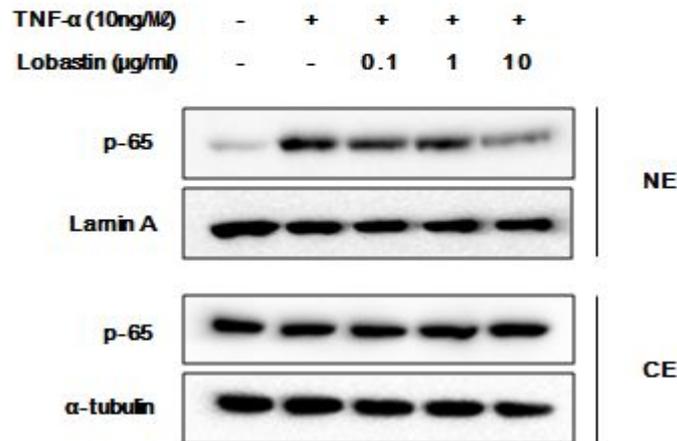
Figure 11. Lobastin inhibits TNF- α -enhanced expression of VCAM-1 protein and mRNA.

The data are expressed as a percentage of TNF- α -stimulated adhesion molecule expression. The mRNA level of VCAM-1 was determined by qRT-PCR. GAPDH served as a housekeeping gene. The results illustrated are from a single experiment, as a representative of three separate experiments. The intensity of the bands was quantitated by densitometry. The levels of VCAM-1 expression are in arbitrary units, and data are normalized to respective amount of GAPDH mRNA. Data are expressed as the mean \pm S.E.M of 3 experiments. * Significantly different from TNF- α -stimulated cells not treated with lobastin ($P < 0.05$).

MOVAS-1 세포에서 p65가 Lobastin에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 p65의 발현을 western blot으로 확인하였고, p65의 전사 활성을 Luciferase assay를 통하여 확인하였다. MOVAS-1 cell에 Lobastin를 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 결과, Lobastin의 농도가 증가할수록 p65의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, I κ B α 의 발현이 Lobastin를 처리함에 따라 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 p65의 전사활성 또한 Lobastin의 농도가 증가함에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



(B)



(C)

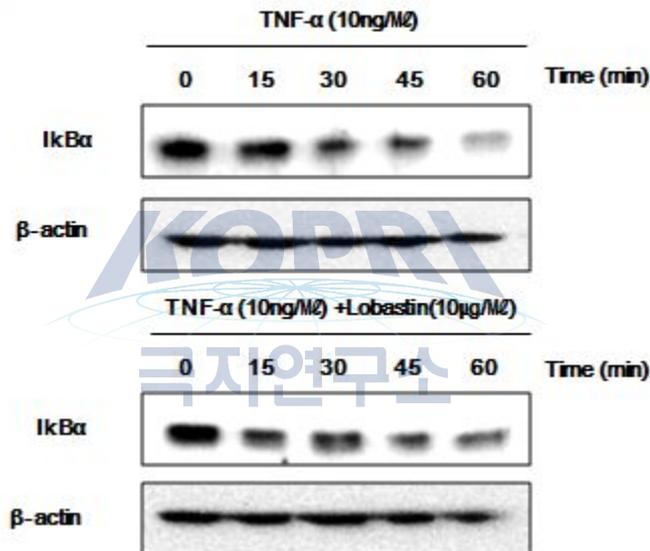
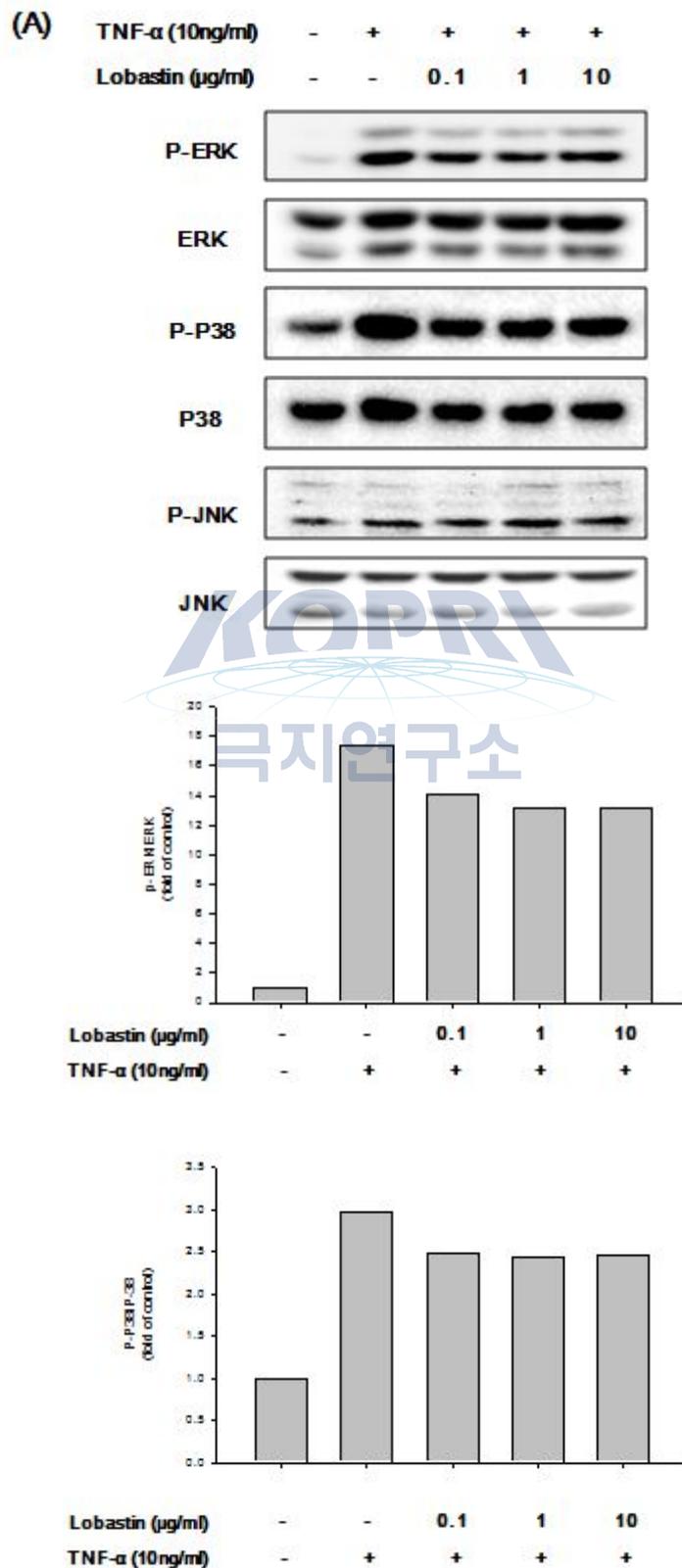


Figure 12. Effects of lobastin on NF- κ B activation and I κ B α degradation in TNF- α -stimulated VSMCs. NE, nuclear extracts; CE, cytoplasmic extracts. (A) MOVAS-1 cells were transfected with a pGL3-NF κ B-Luc repoqRTer plasmid and pCMV- β -gal, pretreated with various concentrations of lobastin for 2 h, and then induced with TNF- α (10 ng/mL) for 4 h. (B) MOVAS-1 cells were preincubated with or without various concentrations of lobastin for 2 h and then treated with TNF- α (10 ng/mL) for 4 h. Cytoplasmic and nuclear levels of NF- κ B p65 were detected by Western blotting to analyze the translocation of NF- κ B. α -Tubulin and Lamin A were used as loading controls for cytosolic and nuclear protein fractions, respectively. (C) MOVAS-1 cells were pre-incubated with or without lobastin (10 μ g/mL) for 2 h, and then induced with TNF- α (10 ng/mL) for indicated times. I κ B α degradation was analyzed by Western blot with anti-I κ B α antibody. The β -actin protein level was considered as an internal control. The results illustrated are from a single experiment, as a representative of three separate experiments.

평활근세포에서 MAP Kinase가 Lobastin에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 ERK, JNK, p38의 발현을 western blot으로 확인하였다. ERK, JNK, p38모두 activity를 가지는 phosphorylated form이 Lobastin의 처리에 의해 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



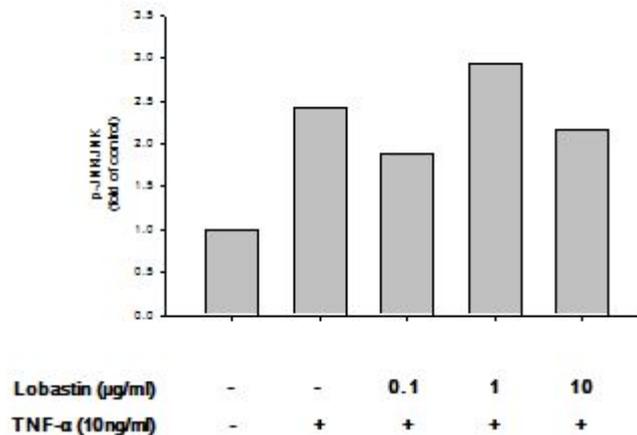


Figure 13. Effect of lobastin on the activation of MAP kinases and expression in TNF- α -stimulated VSMCs. MOVAS-1 cells were pre-treated with the indicated concentrations of lobastin for 2 h and then incubated with TNF- α (10 ng/mL) for 15 min. The whole cell lysates were analyzed by Western blot. The relative intensities were expressed as the ratio of phospho-MAPK to total MAPK. A typical result from three independent experiments is shown.

평활근세포에서 TNF-R1이 Lobastin에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 TNF-R1의 발현을 western blot을 통하여 확인하였다. TNF-R1이 Lobastin의 처리에 의해 농도가 증가할수록 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

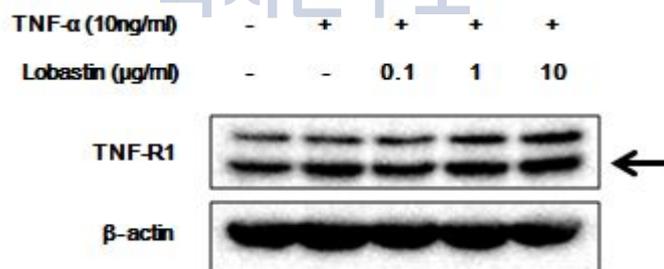


Figure 14. Effect of lobastin on the activation of TNFR1 expression in TNF- α -stimulated VSMCs. MOVAS-1 cells were pretreated with or without indicated concentrations of lobastin for 2 h and then treated with TNF- α (10 ng/mL) for 4 h. The expression of TNFR1 was detected by Western blot with anti-TNFR1 antibody. The β -actin protein level was considered as an internal control. Typical result from three independent experiments is shown. All of Immunoblot band intensities were measured by scanning densitometry (n=3).

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1절 연구개발 목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 양극해 생물 유래 물질의 유방암 세포 사멸기전 연구	1-1 맥관평활근 세포주 MOVAS-1에서 양극해 해양 생물 유래 물질이 세포 외부로의 VCAM-1 발현에 미치는 영향	- 맥관평활근 (VSMCs)세포에서 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 항염증작용 확인 - 맥관평활근세포에서 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin에 의한 세포부착물질 발현 억제 확인	100%
2. 양극해 생물 유래 물질의 지방전구 세포 지방분화 억제효과 측정	2-1 지방전구세포 주 3T3-L1에서 양극해 해양 생물 유래 물질의 지방분화 억제 효과 확인	- 지방전구세포 (preadipocyte)에서 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 항 비만 효과 측정 - Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 항 비만 효과에 관련한 분자면역학적 기전 연구	100%

2절 대외 기여도

가) 기술적인 측면

- 생명과학의 발달에 필요한 세포배양, 면역분석, 유전공학 및 합성기술의 증진 및 집약화
- 면역조절제의 유효성 검색기술 확립
- 면역계 질환의 치료 및 예방기술의 진전

나) 경제 산업적인 측면

- 양극해 해양 생물 유래 물질로부터 면역조절제의 개발은 미개척지의 생물 산업화를 선점함으로써 미래적 가치를 극대화시키고 국제물질 특허 및 국내 제약 산업의 경쟁력 강화에 기여
- 기술 수입비 절감 및 면역질환 치료제의 세계시장 진출

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

양극해 해양 생물 유래 물질에서 발굴되는 유효 물질에 대한 면역반응 조절효과와 그 작용기전에 관한 본 연구결과는 세포내의 작용 기전을 구체적으로 제시하고 있다. 또한 본 연구에서는 항암, 항염증, 항동맥경화, 항비만과 관련하여 연구하였다. 이러한 연구 결과를 기초 자료로 활용하여 in vivo의 동물임상 연구가 진행된다면 인체에 적용할 수 있는 유용한 성분으로 빠르게 개발될 수 있을 것이다. 특히, 본 연구에서는 지금까지 효능 연구에 그쳤던 생리활성소재를 찾는 천연자원의 연구들과는 달리 세포 및 분자생물학적 수준에서의 작용 기전이 규명됨으로써 양극해 해양 생물 유래 물질의 효능이 과학적이고 정확하게 검증됨으로써 이러한 작용 기전을 이용한 관련 질환 치료 및 예방에 구체적으로 적용됨으로써 양극해 산물을 이용한 신약개발에 있어서도 중요한 약물 작용기전 정보를 제공할 수 있으리라 사료된다. 또한, 양극해 해양 생물 유래 물질은 기능성을 부여하는 화장품, 식품첨가제 등의 개발에도 활용될 수 있다.



제 6 장 참고문헌

1. Klimetzek, V and Remold, H. G (1980) The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell Immunol* 53, 237-266
2. Mand, H. M and Vogel, S. N. (1991) Measurement of mouse and human TNF: In current protocols in Immunology eds. pp6.10.1-6.10.5 Greene Publishing and Willey-Interscience New York
3. Ding, A. H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 141, 2407-2412
4. Institoris, L., Siroki, O., and Desi, I. (1995) Immunotoxicity study of repeated small doses of dimethoate and methylparathion administered to rats over three generations. *Human Exp. Toxicol.* 14:879-883.
5. Um SH, Rhee DK, Pyo S. (2002) Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptococcus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. *Int Immunopharmacol.* 2:129-37
6. Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK, Pyo S. (2003) Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Toxicon* 42(6):601-11.
7. Ando I, Tsukumo Y, Wakabayashi T, Akashi S, Miyake K, Kataoka T, Nagai K. (2002) Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- κ B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2:1155-62.
8. Huh JE, Yim JH, Lee HK, Moon EY, Rhee DK, Pyo S. (2007) Prodigiosin isolated from *Hahella chejuensis* suppresses lipopolysaccharide-induced NO production by inhibiting p38 MAPK, JNK and NF- κ B activation in murine peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol.* Dec 15;7(13):1825-33.
9. Choi HS, Yim JH, Lee HK, Pyo S. (2009) Immunomodulatory effects of polar lichens on the function of macrophages in vitro. *Mar Biotechnol (NY)*. 2009 Jan-Feb;11(1):90-8
10. Russell L., Holman, Henry C., McGill, Jr., Jack P., (1960) Strong, Jack C., Geer Arteriosclerosis - The Lesion. *Am. J. Clinical Nutrition*, Vol 8, 85-94
11. Peter Libby. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, Vol. 420, 6917:868-874 .
12. Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A. Jr, Libby, P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler. Thromb.* 13, 197-204 (1993).

13. Ailhaud, G., Grimaldi, P., Negrel, R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12: 207-233, 1992.
14. Acuna UM, Atha DE, Ma J, Nee MH, Kennelly EJ. Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytother Res* 2002;16:63-5
15. Deretic, V., 2006. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 375-382.





1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.