pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 29. No. 3, 431~437 (2016)
http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2016.29.3.431

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

구절초(*Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*)에서 분리된 다당류의 대식세포 면역조절 활성

성낙윤 · 박우용 · 김이은 · 조은지 · 김미환 · 류기형 · †변의홍 · †박윤제
공주대학교 식품공학과

Immuno-Modulatory Activities of Polysaccharides separated from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* in Macrophage Cells

Nak-Yun Sung, Yoo-Young Park, Yi-Eun Kim, Eun-Ji Cho, Mi-Hwan Kim, Gi-Hyung Ryu, †Eui-Hong Byun and †Youn-Je Park
Dept. of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea

Abstract

Macrophages play a pivotal role in the innate and adaptive immune systems. This study investigated the immuno-modulatory activities of polysaccharides separated from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* (CZPS) in macrophages. Polysaccharides from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* were extracted by the ethanol precipitation method. RAW 264.7 mouse macrophage cell line was treated with CZPS (4 to 128 μg/mL), and there was no cytotoxicity at a dose below 32 μg/mL. The levels of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-6, IL-1β) production in the CZPS treated group (32 μg/mL) were 6.5±0.12 μM (NO), 1252.8±79.85 (TNF-α), 305.4±29.41 (IL-6), and 683.3±59.71 (IL-1β), respectively, and they were significantly increased when compared to the control group; 2.2±0.03 μM (NO), 452.3±38.34 (TNF-α), 31.7±5.75 (IL-6), and 184.1±11.52 (IL-1β). Additionally, protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and phosphorylation of MAPKs and NF-κB expression were significantly increased upon CZPS treatment. Therefore, these results indicated that polysaccharides separated from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* (CZPS) may have a potential immunomodulatory activity in macrophages through MAPKs and NF-κB signaling, and this information is useful for the development of immune enhancing adjuvant materials using a natural ingredient.

Key words: *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* polysaccharide, immuno-modulatory activity, macrophage activation, nitric oxide production, cytokine production

서 론

최근 식품소재 및 약용식물 등 천연물에서 분리한 다당류 및 단백질 등과 같은 고분자 물질의 생체 내 면역 활성에 대한 연구가 다양하게 보고되고 있으며, 이들은 합성 의약품에 비해 비교적 낮은 독성을 나타내는 장점이 있다(Hong 등 2012). 이러한 천연물에서 분리된 다당류는 대식세포, 림프구, 자연살해세포 등을 활성화 시켜 면역조절활성을 증진시킨다고 알려져 있다(Jiang 등 2010). 한방에서 활성범위가 매우 넓은 약재인 오가피에서 분리된 다당류는 비장세포 증식 활성, 마우스의 복강에서 분리한 복강 대식세포(peritoneal macrophage)의 pro-inflammatory cytokine의 분비를 증가시켜 면역세포의

† Corresponding author: Youn-Je Park, Dept. of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea. Tel: +82-41-330-1486, Fax: +82-41-330-1489, E-mail: ypark@kongju.ac.kr
Eui-Hong Byun, Dept. of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea. Tel: +82-41-330-1481, Fax: +82-41-330-1489, E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr

활성을 유도하며, 암세포의 전이를 억제시키는 것으로 보고되었다(Ha 등 2003).

인체의 면역계는 매우 복잡하고 다양한 면역세포들간의 상호작용에 의하여 그 체계가 유지된다고 알려져 있으며, 외부 병원성 항원이 생체내로 침입하였을 때 가장 먼저 반응하는 면역세포로는 단핵구(monocyte), 호중구(neutrophile) 및 포식세포(phagocyte) 등이 있다(Cha & Lim 2014). 이들 중 대식세포는 대표적인 포식세포로써 외부 항원을 포식하고, 면역조절인자인 nitric oxide(NO)와 pro-inflammatory cytokine을 분비하여 선천면역의 활성을 유도할 뿐만 아니라, 외부 항원을 인식하여 면역 T세포에 전달하여 적응면역시스템의 활성에도 크게 기여하는 것으로 보고되고 있다(Erwig & Rees 1999). 대식세포들은 면역조절물질인 cytokine들을 분비함으로 면역반응을 매개한다. 즉, 대식세포로부터 분비된 다양한 cytokine류들은 자기 자신을 활성화 시켜 포식작용을 증가시키거나, 또는 자연살해세포, 수지상세포 등의 선천면역을 매개하는 세포뿐 아니라, 적응면역을 담당하는 T림프구를 활성화 하거나 분화를 조절한다고 알려져 있다(Jiang 등 2010).

구절초(*Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로, 음력 9월 9일에 꺾이는 풀이라는 뜻으로 구일초(九日草)라고도 불리며, 국내에는 각처의 산지 및 고원지에서 자생하고 세계적으로는 일본, 만주, 러시아 및 중국에서 자란다. 오래전부터 구절초는 월경 불순, 자궁 냉증 및 불임증 등의 부인병의 약제로서 사용되어 왔으며, 진통 소염작용이 강하고 성질이 따뜻하여 고혈압 및 위장병을 치료하는데 효과가 있다고 알려져 있다(Lee & Lee 2007). 기존의 연구에서 구절초의 대표적인 생리활성 물질로 플라보노이드계통의 linarin이 분리되었으며, linarin는 인체 내에서 항염증, 해열 및 간 보호 작용을 한다고 보고되었다(Kim 등 2001). 그 외에도 구절초 추출물의 항암, 항산화 및 항비만 등의 보고된 바 있으나(Kwon 등 2006; Chung & Jeon 2011; Park 등 2015), 구절초에서 분리된 다당류의 면역 활성 효과에 관한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다.

본 연구는 구철초에서 분리한 다당류의 면역활성능에 관하여 알아보기 위하여 마우스 기원의 대식세포주인 RAW 264.7에 구절초에서 분리한 다당류를 처리하여 면역조절 물질인 NO, pro-lnflammatory cytokine의 분비능과 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 단백질 발현, mitogen-activated protein kinase (MAPK) 인산화 및 nuclear factor(NF)-κB의 발현 등에 미치는 영향에 관하여 알아보았다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에서 사용된 구절초는 세종특별자치시 장군면 영평사에 군락지를 이루고 있는 구절초를 채집하였고, 채집 시기는 11월이었으며, 조다당 추출에 사용하였다.

2. 구절초 조다당(CZPS) 추출

건조된 구절초를 실험용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하고, 구절초 분말 10 g에 200 mL의 distilled water를 가하여 100℃에서 2시간 동안 열수 추출하였다. 추출물을 Filter paper(No. 4, Whatman, Kent, UK)로 여과하고, 여과액에 70% 에탄올을 가하여 4℃에서 12시간 동안 방치한 후, 원심분리(5,000 rpm, 20 min)하여 침지된 조다당(CZPS)을 분리하고, 이를 동결건조하여 실험에 사용하였다. 구절초 추출물로부터 얻어진 조다당의 수율은 3.42%(g/g)였다.

3. 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell은 한국 세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양을 위해 100 unit/mL의 penicilin 및 streptomycin과 5% fetal bovine serum (FBS)을 포함하는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지(Welgene, Namcheon, Gyeongsan, Korea)를 사용하였으며, 세포는 37℃, 5% CO_2 incubator(Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 평가

CZPS의 처리에 따른 대식 세포의 세포 생존율 및 NO 및 cytokine 분비능의 실험은 Byun & Byun(2015)의 방법에 따라 수행하였다. RAW 264.7 cell을 96 well plate에 3×10^4 cell/well의 농도로 분주한 후 37℃, 5% incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, CZPS를 phosphate buffered saline(PBS; Welgene, Namcheon, Gyeongsan, Korea)에 용해하여 4, 8, 16, 32, 64 및 128 μg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였다. Well당 20 μL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; thiazolyl blue(MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) MTT 용액(1 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 시약의 첨가로 생긴 formazan을 녹이기 위해서 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich)를 100 μL씩 첨가하고, 1시간 후 micro-plate reader(Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도을 측정하였으며, Control(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포생존율을 비교하였다.

5. Nitric oxide(NO) 유도능 평가

48 well plate에 RAW 264.7 cell을 5×10^4 cell/well로 분주한 후, 37℃, 5% CO_2 incubator에 12시간 동안 배양하면서 세포

를 완전히 부착시키고, PBS에 용해된 CZPS(8, 16 및 32 μg/mL) 및 양성대조군인 lipopolysaccharide(LPS; Sigma-Aldrich)을 1 μg/ mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 분리하였다. 분리된 배양 상등액 100 μL에 동량의 Griess (Sigma-Aldrich) 시약을 처리하여 10분 동안 암실에서 반응시킨 후 micro-plate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite($NaNO_2$, Sigma-Aldrich)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

6. Cytokine 분비 유도능 평가

48 well plate에 RAW 264.7 cell을 5×10^4 cell/well로 분주한 후, 37℃, 5% CO_2 incubator에 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, PBS에 용해된 CZPS(8, 16 및 32 μg/mL) 및 양성대조군인 lipopolysaccharide(LPS; Sigma-Aldrich)을 1 μg/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 배양 상등액을 분리하였다. 분리된 배양 상등액에서 tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-1β 및 IL-6의 함량을 측정하였다. Cytokine 함량은 ELISA kit(eBioscience Co., San Diege, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 cytokine의 농도는 kit에 포함되어 있는 표준용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

7. Western blot analysis

RAW 264.7 대식세포를 6 well plate에 1×10^6 cell/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고, CZPS를 18 및 32 μg/mL의 농도로 처리하였다. 30분후 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 다음, NP40 Cell lysis buffer (Biosource, Seoul, Korea)를 첨가한 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리해서 cell lysate를 분리하였다. 핵 내의 단백질을 분리하기 위해서 cell lysate에 저장성 완충액[10 mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)(HEPES), pH 7.9, 1.5 mM magnesium chloride($MgCl_2$), 10 mM potassium chloride(KCl), 0.5 mM dithiothreitol(DTT), 1 μM leupeptin과 0.2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF)]을 20분간 처리한 후 12,000×g에서 1분간 원심분리하여 세포질과 핵을 분리하였으며, 분리된 핵을 고장성 완충액[20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM ethylene diamine tetra acetic acid 0.5 mM DTT, 1 μM leupeptin, 0.2 mM PMSF]을 처리하여 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 분리된 단백질은 BCA protein detection kit(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질 정량을 실시하였으며, well당 20 μg의 cell lysate를 10% polyacrylamide gel에 각각 loading하여 SDS-PAGE로 변성 분리하였다. 이를 polyvinylidene difluoride membrane(Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 transfer 하였고, membrane은 anti-body의 비 특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution(skim milk 5%) 20 mL에서 2시간 동안 방치하였다. 이후 TBST(20 nM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며, iNOS, p-38, phosphate-p38, ERK, phosphate-ERK 및 phosphate-NF-κB의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체(Cell siginaling Technology, Danvers, MN, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4℃에서 overnight 시키고, TBST로 10분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항체(goat-anti rabbit lgG, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 1:4,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, TBST로 10분간 5회 세척하였으며, 현상을 위하여 electrochemiluminescence(ECL; Millipore Merck KGaA) reagent를 사용하여 인화하였다.

8. 통계분석

이상의 모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 Statistical Package for Social Scienecs(SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) sotfware를 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Student's two tailed *t*-test로 $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 및 $^{***}P<0.001$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

1. CZPS의 대식세포 생존율에 미치는 영향

CZPS가 대식세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 RAW 264.7 cell에 농도별 CZPS를 처리하여 CZPS에 대한 세포 생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). CZPS를 4, 8, 16, 32, 64 및 128 μg/mL의 농도로 처리하였을 때, 4, 8, 16 및 32 μg/mL의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으나, 64 및 128 μg/mL의 농도에서 세포독성을 나타냈다. 따라서 대식세포에 대한 CZPS의 면역활성능(cytokine 및 NO의 생성능) 평가 시 CZPS의 농도를 세포 독성이 나타나지 않는 농도인 8, 16 및 32 μg/mL로 고정하여 실험하였다.

2. CZPS의 iNOS 관련 NO 생성에 미치는 영향

대식세포는 수지상세포와 함께 선천면역을 담당하는 주된 세포로서, 생체로 유입되는 항원에 대하여 자기(self) 및 비자기(non-self)를 인식하여 외부 병원성 항원을 포식하는 역할을 수행한다. 외부로부터 들어오는 비자기(non-self) 항원이 생체 내에 침입했을 때, 대식세포가 이를 포식하여 활성화되면, 포식된 항원에 대한 정보를 적응면역 시스템의 주된 역할을 수행하는 면역세포인 T 세포에 제시하여 세포매개성 면역반응이 일어난다(Jiang 등 2010). 따라서 생체 내 면역계의 활성은 외래 항원에 대한 면역기능을 수행하는 데 효과적이므로, 다양한 천연물의 면역기능 활성 여부를 판단하는데 있어서 대식세포 활성화 여부를 주로 평가한다.

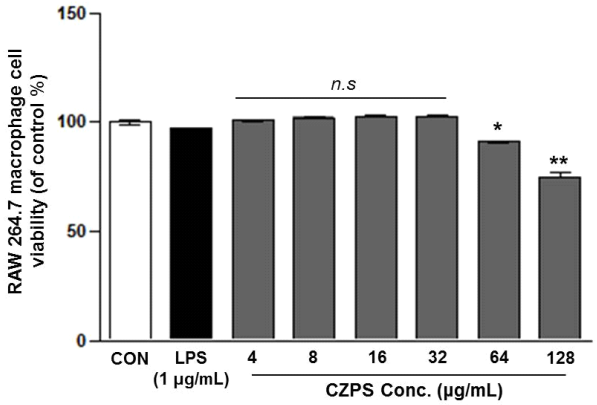

Fig. 1. Effect of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* polysaccharide (CZPS) on cell proliferation in RAW 264.7 cells. CZPS were treated at the concentration of 4, 8, 16, 32, 64, and 128 μg/mL and LPS (1 μg/mL) used as a positive control. After 24 h, cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as the mean±S.D. (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of $^{*}p<0.05$, and $^{**}p<0.01$ compared to control (CON) group. $^{N.S.}$: denoted no significance.

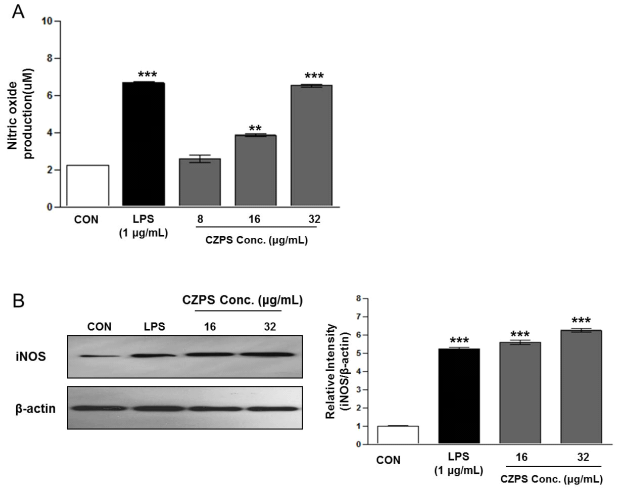

Fig. 2. Effect of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* polysaccharide (CZPS) on iNOS-mediated NO production activity of RAW 264.7 macrophage cells. (A) Dose-dependent effect of CZPS (8, 16, and 32 μg/mL) on NO production was analyzed by Griess reagent assay. LPS (1 μg/mL) used as a positive control (B) Effect of CZPS (16, 32 μg/mL) of iNOS expression in cell lysate was investigated by western blotting. Results are expressed as the mean±S.D. (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of $^{**}p<0.01$, and $^{***}p<0.001$, compared to control (CON) group.

CZPS의 처리가 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해서 RAW 264.7 마우스 대식세포에 CZPS를 처리한 후 세포 상등액에서 pro-inflammatory cytokine인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6와 iNOS 단백질 발현 및 NO 생성에 대해서 알아보았다. 세포독성에 영향을 미치지 않는 농도인 8, 16 및 32 μg/mL로 CZPS로 처리하여 iNOS 단백질 발현 및 NO의 분비능을 확인한 결과, CZPS의 처리는 iNOS의 단백질의 발현의 활성뿐만 아니라, NO의 분비능도 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 또한 본 연구에서 양성 대조구로 사용된 LPS 처리에 따른 NO 분비량과 결과를 비교하였을 때, CZPS 처리구의 NO 분비량이 적게 나타나는 것으로 보아 과도한 염증 반응에 의한 cytokine 분비는 아닌 것으로 사료된다. 대식세포 내부에는 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS (eNOS) 및 iNOS의 세 종류의 NOS가 존재하며, nNOS와 eNOS는 대식세포 내부에서 항상 발현이 유지되는 반면에, iNOS는 활성화 상태에서만 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다(Miyasaka & Hirata 1997). 항원을 포식하여 활성화된 대식세포는 세포 내부의 iNOS 단백질의 발현을 증가시킴으로써, 세포 내에서 L-arginin을 NO로 전환을 유도한다(Schmidt & Walter 1994). 활성화된 대식세포가 분비하는 NO는 강한 이 원자 자유라디칼로 미생물의 감염된 세포나 암세포의 증식을 제어하는 등의 다양한 체내방어기능을 가지고 있는 인체 내 중요한 물질이다(Lee 등 2006). 하지만 과도한 NO의 분비는 염증성 질환을 유도하여 세포 및 조직에 손상을 입히는 것으로 보고된 바 있어서, 세포 및 조직에 손상을 주지 않는 적절한 NO 농도를 유지하는 것이 매우 중요하다(Jeong 등 2012). 따라서 세포독성이 없는 농도에서 iNOS 발현 및 NO 생성의 증가는 체내 면역시스템을 활성화 시키는 것으로 판단할 수 있다. 본 연구에서도 세포 독성을 확인할 수 없는 8, 16 및 32 μg/mL 농도에서 CZPS를 처리하였을 때, iNOS 단백질 발현 및 NO 분비능이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되어 CZPS의 처리는 대식세포를 활성화를 유도시켜 체내 면역계의 활성을 증강시키는 것으로 사료된다.

3. CZPS의 cytokine 분비능에 미치는 영향

Cytokine은 면역반응의 매개자로서 면역반응을 유도하는데 있어 매우 중요한 역할을 수행하는 면역조절인자이며, 대식세포에서 분비하는 대표적으로 pro-inflammatroy cytokine로서 TNF-α, IL-1β 및 IL-6가 있다(Jeong 등 2012). 활성화된 면역세포에서 분비되는 TNF-α는 종양괴사인자로서 종양세포에 대한 세포독성을 일으키는 물질이지만, LPS 등의 외부 자극에 의하여 그 양이 지나치게 많아지면 급성 및 만성 염증과 암세포의 생성과정에서 일어나는 피부염증을 유발한다고 보고되었다(Wang 등 2003). 또한 IL-1β 및 IL-6는 국소면역의

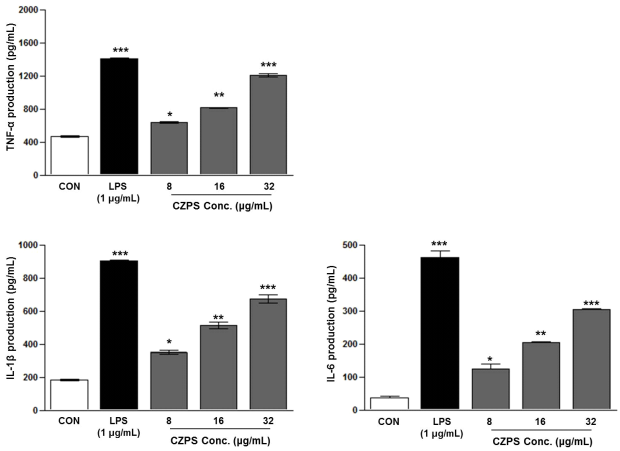

Fig. 3. Effect of cytokine (TNF-α, IL-1β, and IL-6) production of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* polysaccharide (CZPS) in RAW 264.7 macrophage cell line. CZPS were treated at the concentration of 8, 16, and 32 μg/mL in RAW 264.7 cells. LPS (1 μg/mL) used as a positive control. After 24 hr, cytokine productions in culture supernatant were investigated by using ELISA kits. Results are expressed as the mean±S.D. (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, and $^{***}p<0.001$, compared to control (CON) group.

활성 및 T세포의 활성화를 통해서 적응면역을 개시하여 체내 면역시스템을 강화시키지만, 과도한 염증반응으로 인하여 대량생산될 경우, 만성염증을 일으켜 증상을 악화시킨다고 보고되었다(Lebovic 등 2000; Mcdaniel 등 1996).

본 연구에서 CZPS의 처리가 대식세포의 cytokine 분비능에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위해하여 RAW 264.7 마우스 대식세포에 농도별 CZPS를 처리한 후 세포 배양 상등액에서 cytokine 함량에 관하여 관찰하였다(Fig. 3). 앞선 세포독성 실험에서 대식세포의 독성에 영향을 미치지 않았던 최적 농도(8, 16 및 32 μg/mL)로 CZPS를 처리하여 cytokine 유도 분비능에 관하여 관찰한 결과, CZPS의 처리는 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 분비능을 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 관찰되었다. 따라서 구절초로부터 분리된 다당류인 CZPS는 NO의 분비능을 증가시킬 뿐만 아니라, 면역활성 조절 물질인 cytokine의 분비능 또한 증가시켜 대식세포의 면역활성에 기여하는 것으로 사료된다.

4. CZPS의 MAPKs 인산화 및 NF-κB의 발현에 미치는 영향

생체 내의 면역세포가 외부로부터 유입되는 항원을 인식하고 포식하면서 발생하는 선천면역반응에 있어서 MAPKs와 NF-κB는 매우 중요한 역할을 수행하는 조절 인자이다. 면

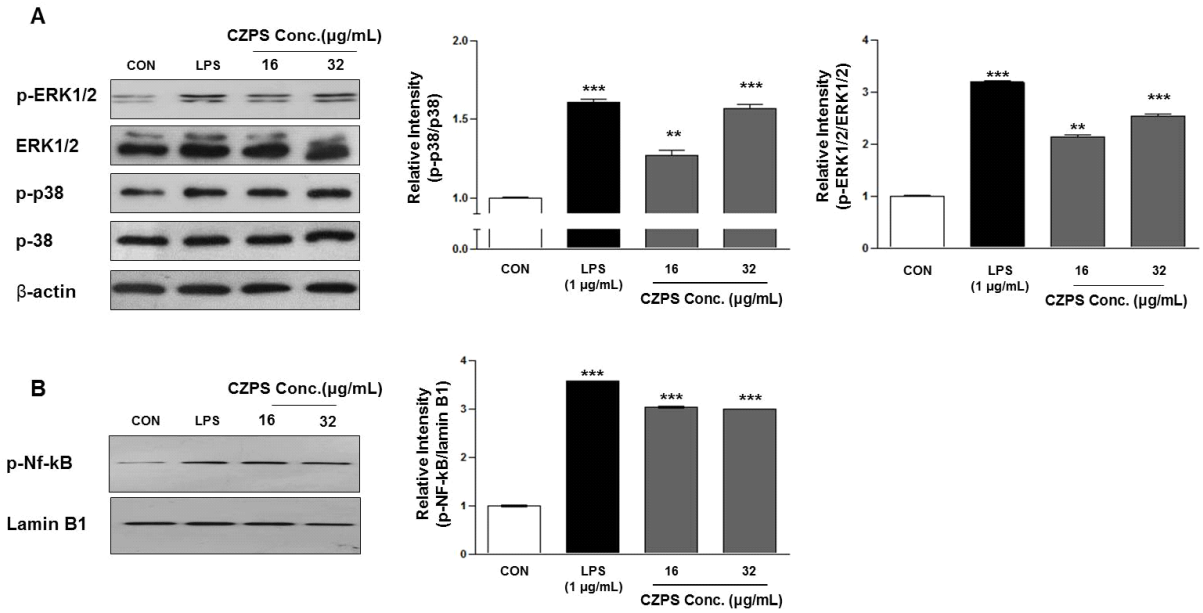

Fig. 4. Effect of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* polysaccharide (CZPS) on MAPKs phosphorylation and NF-κB expression in RAW 264.7 macrophage cells. CZPS were treated at the concentration of 16 and 32 μg/mL for 30 min. LPS (1 μg/mL) used as a positive control. MAPKs phosphorylation and NF-κB expression evaluated by western bolt analysis using specific antibodies to p38, phospho-p38, ERK1/2, phospho-ERK1/2 (A) and phospho-NF-κB (B). Results are expressed as the mean±S.D. (n=3). Relative band intensity of each protein was expressed. Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, and $^{***}p<0.001$, compared to control (CON) group.

역세포 내 신호 전달에 관여하는 MAPKs는 외부로부터 세포 내부로 들어오는 자극에 대한 신호에 의해서 활성화가 일어나고, NF-κB가 핵 내로 이동하면서 핵 내부의 AP-1 transcription factor 및 cAMP-responsive element binding protein(CREB) 등의 다양한 전사인자들을 활성화시킨다(Brewer 등 1992). 현재까지 면역반응을 조절하는 것으로 널리 알려진 MAPK로는 ERK1/2, JNK 및 p38이 있으며(Kang 등 1995), 각 단백질의 인산화에 의해서 활성의 유무를 판단한다(Dong 등 2002). 활성화된 MAPKs는 직접적으로 inhibitory kappaB(Iκ-B)를 인산화 시킴으로써 Iκ-B와 결합되어 존재하는 NF-κB가 활성화가 진행되도록 유도하며, 활성화된 NF-κB가 핵 내로 이동하고, 핵 내부에서 전사인사로서 세포의 증식과 분화의 유도 및 사이토카인들의 생산에 관련되는 다양한 단백질의 생산을 유도한다(Chun & Surh 2004).

본 연구에서 CZPS의 처리에 따른 대식세포의 활성화의 세포내 정확한 신호전달 기작에 관하여 알아보기 위해서 대식세포에 CZPS의 농도를 16 및 32 μg/mL로 처리하고, MAPKs (p38, ERK)와 NF-κB의 인산화 정도를 관찰하였다. 실험결과, CZPS의 처리 농도가 증가할수록 MAPKs(p38, ERK)의 인산화가 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 핵내 NF-κB의 인산화는 CZPS 농도 구배에 따른 차이는 보이지 않았지만, 대조구(CZPS 무첨가구)에 비교하여 볼 때, 유의적으로 증가된 것으로 관찰되었다(Fig. 4). 따라서 본 연구에서 CZPS의 처리에 의하여 대식세포의 면역활성 매개 물질인 NO 및 cytokine의 분비가 증가된 것은 MAPKs 및 NF-κB의 인산화 증가에 따른 영향인 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 전통약재로 주로 사용되는 구절초에서 분리한 다당류(CZPS)가 선천 및 적응면역에서 중추적인 역할을 수행하는 대식세포의 활성화에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다. 구절초에서 분리한 다당류를 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 cell에 처리하였을 때, iNOS의 발현을 조절하여 NO의 생성이 증가되었으며, 또한 면역활성 물질인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등의 cytokine의 분비능이 증가되었으며, 이러한 면역활성 매개자인 NO 및 cytokine의 증가의 원인에 관한 정확한 면역세포내 신호전달에 관하여 알아본 결과, CZPS 처리는 MAPKs(ERK, p38)의 인산화를 촉진시키며, 이로 인한 전사인자인 NF-κB의 인산화를 증가시켜, 대식세포의 활성화를 유도시키는 것으로 관찰되었다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “지역특화산업육성사업”(R0004042)으로 수행된 연구결과입니다.

References

Brewer MS, Ikins WG, Harbers CAAZ. 1992. TBA values, sensory characteristics, and volatiles in ground fork during long-term frozen storage: Effects of packaging. *J Food Sci* 57:558-563

Byun MW, Byun EH. 2015. Immunological synergistic effects of combined treatment with herbal preparation (HemoHIM) and red ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 182-190

Cha JH, Lim EM. 2014. Effects of *Gardeniae fructus* on cytokines in mouse macrophage. *J Korean Obstet Gynecol* 27: 1-16

Chun KS, Surh YJ. 2004. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: Potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 15:1089-1100

Chung HJ, Jeon IS. 2011. Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. *Korean J Food Preserv* 18:739-745

Dong C, Davis RJ, Flavell RA. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20:55-72

Erwig LP, Rees AJ. 1999. Macrophage activation and programing and its role for macrophage function in glomerular inflammation. *Kidney Blood Press Res* 22:21-25

Ha ES, Hwang SH, Yu KW, Shin KS, Cho HM, Kim CH, Park WM, Yoon TJ. 2003. Immnistimulation activity of the crude polysaccharides fractionated from *Elutherococcus senticosus,* and its application to prevent of tumors by combination therapy with cisplatin. *Yakhak Heoji* 47:159-166

Hong HD, Cho CW, Rhee YK, Choi HD, Lee HS. 2012. Status of technology development using immune-modulating polysaccharide. *Food Sci Ind* 45:1-11

Jeong H, Sung M, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. 2012. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:888-894

Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. 2012. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J Plant Res* 25:299-307

Jiang MH, Zhu L, Jiang JG. 2010. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin Ther Tar* 14:1367-1402

Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27:978-984

Kim YY, Lee SY, Yim DS. 2001. Biological activities of linarin from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. *Yakhak Heoji* 6:604-610

Kwon HS, Ha TJ, Hwang SW, Jin YM, Nam SH, Park KH, Yang MS. 2006. Cytotoxic flavonoid from the whole plants of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* Kitamura. *J Life Sci* 16:746-749

Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. 2000. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1β. *Mol Hum Reprod* 6:269-275

Lee HJ, Lee CW, Choi MS, Son DJ, Hong JT. 2006. Effects of esthetic essential oils on LPS-induced nitric oxide generation in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 32:111-116

Lee SH, Lee JS. 2007. Production and characteristics of anti-dandruffy compound from *Chrysanthemum zawadskii*. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35:220-225

Mcdaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211:24-32

Miyasaka N, Hirata Y. 1997. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci* 61:2073-2081

Park JA, Jin KS, Kwon HJ, Kim BW. 2015. Antiobesity activity of *Chrysanthemum zawadskii* methanol extract. *Journal of Life Science* 25:299-306

Schmidt H, Walter U. 1994. NO a work. *Cell* 78:919-925

Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 2003. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: An *in vitro* cytokine study using mouse macrophage. *Clin Chim Acta* 327:123-128

Received 2 May, 2016
Revised 30 May, 2016
Accepted 22 June, 2016