

## 국내 상업용 간장과 재래식 간장 유래 다당에 의한 대식세포 활성화

이 문 수 · \*신 광 순  
경기대학교 식품생물공학과

### Macrophage Activation by Polysaccharides from Korean's Commercial and Traditional Soy Sauces

Moon-Su Lee and \*Kwang-Soon Shin

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

#### Abstract

The varying characteristics between Korean's commercial and traditional soy sauces may be initiated by raw materials and fermentation techniques such as the koji and *mezu* process. We have examined properties of polysaccharides isolated from two different soy sauces which were made by the commercial process (CSP-0) and the traditional Korean process (KTSP-0) as well as their macrophage activities. Two polysaccharides have not effected the RAW 264.7 cells viability. The effects of CSP-0 and KTSP-0 on RAW 264.7 cells were demonstrated by the production of nitric oxide (NO), and reactive oxygen species (ROS). The CSP-0 and KTSP-0 significantly augmented NO and ROS productions by RAW 264.7 cells under a dose dependent manner. However, the activity of KTSP-0 was more potent than that of the CSP-0 at 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The productions of IL-6 and TNF- $\alpha$  were determined by real-time PCR and ELISA. mRNA expression levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  by KTSP-0 at 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  indicated 63 and 71 times higher than negative controls, respectively. Also, the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  by KTSP-0 at 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  showed 32.1 and 4.5 times higher than those by the CSP-0. To assess phagocytosis activities, the effects of CSP-0 and KTSP-0 on mRNA expression of Fc receptor I and II (FcR I, II) are being determined by RT-PCR products. Only the KTSP-0 showed enhanced expressions of mRNA expression for FcR I in a dose dependent manner, whereas the CSP-0 did not affect either the FcR I or II expressions. The above data lead us to conclude that the macrophage activations of Korean traditional soy sauce polysaccharide are higher than that of the commercial soy sauce polysaccharide.

Key words: soy sauce, polysaccharide, nitric oxide, reactive oxygen species, cytokine

#### 서 론

면역계는 생체 내에서 자연적으로 발생하거나 외부인자들에게 기인한 각종 이상 현상을 제거하여 신체의 항상성(homeostasis)을 유지시키는 생명현상으로 항원에 대한 특이성에 따라 선천면역(innate immunity, nonspecific immunity)과 후천면역(adaptive immunity, specific immunity)으로 구분된다(Hoebe 등 2004). 선천면역은 항원에 비의존적이고 빠르게 일어나는 반응이며, 피부나 점막과 같은 물리적 방어막 이외에도 보체계(complement system) 활성화의 부경로(alternative pathway)

와 대식세포(macrophage), 자연 살해세포(NK cell) 등의 면역 세포들이 관여한다(Hoebe 등 2004). 선천면역계에서 생체방어 기구의 초기 반응을 담당하는 대식세포는 lysosome이 발달한 단핵 세포로서 조직 내에서 탐식작용이 왕성하고, 선천면역과 후천면역 모두 관여하는 면역세포이다. 대식세포 방어 기전과 관련된 수용체는 미생물을 인식하고 살해하는 탐식 패턴 인식 수용체(endocytic pattern-recognition receptors) 및 면역계의 활성화를 조절하는 신호 패턴 인식 수용체(signaling pattern-recognition receptors)로 나눌 수 있다(Arancibia 등 2007; Booth 등 2007). 즉, 탐식 패턴 인식 수용체에 인식된 외래 물

\* Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea. Tel: +82-31-249-9655, Fax: +82-31-249-9655, E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr

질은 식세포(phagocytes)에 의하여 살해되고, 신호 패턴 인식 수용체에 인식된 물질들은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12와 같은 다양한 cytokine들을 생산함으로써 선천면역 및 적응면역계에 항원 제시를 하는 작동 세포의 활성화에 관여한다(Arancibia 등 2007; Booth 등 2007). 이러한 면역 반응은 항원을 포함한 항원 제시 세포(antigen presenting cell; APC)가 생산하는 cytokine 및 항원 제시 세포로부터 항원을 제시 받은 보조 T세포가 생산하는 항원 특이적 cytokine에 의하여 조절되어진다(Arancibia 등 2007; Booth 등 2007). 더욱이 대식세포는 배아 발생(embryogenesis), 상처 치유, apoptic cell의 제거, 조혈세포 증식(hematopoiesis) 과정 동안 조직의 재형성에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Lingen MW 2001; Klimp 등 2002).

대두를 주원료로 제조하는 발효 조미료인 간장(soy sauce)은 오랜 전통을 가진 대표적인 발효식품으로 우리나라의 식문화에서 중요하게 여겨져 왔으며, 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 세계적으로 사용범위가 넓어지고 있다(Yokotsuka T 1986). 간장은 조미료의 기능 이외에도 *E. coli* O157:H7에 대한 항균 활성(Masuda 등 1998), angiotensin I-converting enzyme(ACE) 억제 활성(Kinoshita 등 1993), 혈전 생성 억제 활성(Tsuchiya 등 1999) 및 간장에 함유된 4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanon(HEMF), 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone(HMF)와 같은 향기성분에 의한 항암 활성(Benjamin 등 1991; Kataoka 등 1997)등이 알려지며 관심이 집중되고 있다. 또한 최근 일본식 간장(Shoyu)으로부터 얻어진 다당의 철분 흡수 증진 효과(Kobayashi 등 2006), 알레르기 억제 효과(anti-allergic effects)(Kobayashi 등 2004), 장관면역 증진 활성(Matsushita 등 2008), macrophage 및 lymphocyte 기능 증진 효과(Matsushita 등 2006) 등의 기능성이 보고되기도 하였다. 현재 시판되는 대부분의 상업용 간장은 일본식 간장처럼 밀과 콩을 원료로 하여 곰팡이류에 의해 발효하는 koji 방식으로 만들어지고 있는데, 우리나라의 전통 재래식 간장의 경우, 대두만을 사용하고, 주로 *Bacillus subtilis* 등 세균에 의해 발효되는 메주 방식으로 제조되므로 상업용 간장과 전통 간장 간에는 원료, 제조과정, 발효미생물 및 숙성기간 측면에서 큰 차이가 있으며, 따라서 각각에서 얻어진 간장 유래 다당의 특성도 상이할 것으로 예상된다(Lee 등 2009). 최근 저자 등은 상업용 양조간장과 재래식 간장으로부터 다당을 분리하여 화학적 특성의 상이함과 보체계 활성을 비교한 바도 있다(Park 등 2012). 따라서 본 연구에서는 일본식으로 만들어진 상업용 간장과 우리나라 전통방식으로 만들어진 재래식 간장으로부터 얻어진 다당의 대식세포 활성을 비교함으로써 우리나라 전통 재래식 간장의 우수한 기능성을 규명하기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용한 상업용 간장은 국내 'A' 식품(Korea) 제품 중 대두(*Glycine max*)와 밀(*Triticum aestivum*)만을 사용하여 koji 방식으로 만들어진 100% 양조간장을 대형 유통마트에서 구입하여 사용하였으며, 우리나라 재래식 간장은 전북 순창에 소재한 농림부 지정 전통식품 제조업체인 'L' 전통식품(Korea)에서 전통방식으로 제조 및 숙성된 조선간장을 구입하여 사용하였다.

### 2. 간장 다당의 분리

각각의 간장 1 l 에 최종농도가 80%가 되도록 약 4배의 에탄올을 첨가하여 하룻밤 방치한 후, 원심분리(6,000 rpm, 30 분)하여 침전물을 얻었으며, 여기에 소량의 증류수를 가하여 침전물을 재용해하고, 최종농도 약 60%가 되도록 2배의 에탄올을 첨가하여 재차 침전물을 회수하였다. 본 침전물은 증류수에 재용해한 다음 dialysis tubing cellulose membrane(MW cut off 12,000, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 2~3일간 투석을 행하였으며, 동결건조하여 실험에 사용하였다.

### 3. RAW 264.7 세포에 대한 독성 측정

Mouse leukaemic monocyte macrophage 유래 세포주인 RAW 264.7(ATCC<sup>®</sup> TIB 71TM) 세포는 미국 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 10% FBS를 함유한 MEM 배지(Welgene Inc. Daegu, Korea)를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포를 2.5×10<sup>6</sup> cells/ml의 세포농도로 조정된 후 96-well microplate에 100  $\mu$ l씩 분주하고, 각 농도의 시료를 100  $\mu$ l씩 처리하여 3일간 배양하였으며, 생육 정도를 측정하기 위해 CCK-8(Cell Counting Kit-8, Dojindo Co. Ltd., Kumamoto, Japan)을 제조사의 지침에 따라 사용하였다.

### 4. Nitric Oxide(NO), Reactive Oxygen Species(ROS), cytokine 생산능 측정

상기에 제시된 방법으로 세포를 24시간 배양하고, 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 후 세포 배양액을 회수하여 배양액 중 생산된 NO, ROS 및 cytokine 생산능을 확인하였다. 세포 배양액 내의 NO는 Griess reagent(Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 세포 내의 ROS는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 활성 산소에 의해 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)을 형성하는 반응을 이용, 배양 후의 세포에 10  $\mu$ M의 DCFH-DA를 첨가하여 2시간 동안 배양시킨 후, 세포를 용해

시켜 상등액의 형광값을 형광측정기(Victor-2, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)를 이용해 excitation 450 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. 세포 배양액 내의 IL-6, TNF- $\alpha$ 는 ELISA kit(BD Biosciences, Co., Ltd., San Diego, CA, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

### 5. RNA 추출 및 First-Strand cDNA 합성

RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml의 세포농도로 조정된 후 6-well microplate에 1 ml씩 분주하고, 각 농도의 시료를 1 ml씩 처리하였다. 4시간 배양한 후 배양 상등액을 제거하고, PBS로 세척 후 Trizol reagent(Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA)를 이용해 total RNA를 추출하였다. First-strand cDNA 합성은 1  $\mu$ g의 total RNA를 사용하여 Revertaid first strand cDNA kit(Fermentas., Ontario, Canada)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 진행하였다.

### 6. Real-Time PCR

Real-time PCR은 SYBR green supermix(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였고, CFX96 real-time PCR system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 DNA를 증폭하였다. Primer는 IL-6(sense, 5'-CTGGAGTACCATAGCTACCTGGA-3'; antisense, 5'-GTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'), TNF- $\alpha$ (sense, 5'-TAC TCCCAGGTTCCTCAAGG-3'; antisense, 5'-CTGGAAGACT CCTCCCAGGTAT-3'), GAPDH(sense, 5'-AACTTTGGCATTGT GGAAGG-3'; antisense, 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3')를 Bioneer사(Daejeon, Korea)에서 제작하여 10 pM이 되도록 반응하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C-3분(초기변성)하고, 95 $^{\circ}$ C-30초(변성, denaturation), 60 $^{\circ}$ C-30초(결합반응, annealing), 72 $^{\circ}$ C-30초(연장반응, extension)로 39회 목적 DNA를 증폭하였으며, melting curve 분석은 증폭과정 후 95 $^{\circ}$ C-10초, 60 $^{\circ}$ C-5초, 95 $^{\circ}$ C-10초의 조건으로 분석한 후 mRNA의 발현량은  $2^{-\Delta Ct}$  방법을 이용하여 정량하였다.

### 7. Reverse Transcriptase-PCR(RT-PCR)

RT-PCR은 Taq DNA polymerase kit(Komabio, Seoul, Korea)를 이용, cDNA 2  $\mu$ l, 5 units/ $\mu$ l Taq polymerase 0.2  $\mu$ l, 10 $\times$ Taq PCR buffer 2  $\mu$ l, 2.5 mM 10 $\times$ dNTP mixture 1.6  $\mu$ l 및 10 pM primer 1  $\mu$ l를 섞고, 증류수로 전체를 20  $\mu$ l 맞춰 PCR 증폭시켜 관련된 mRNA의 발현을 확인하였다. Primer 염기서열은 Matsumoto 등(1993)의 연구를 참고하여 사용하였다. Fc receptor I(FcR I)의 발현을 위해 DNA thermal cycler(Takara bio., Shiga, Japan)를 이용하여 94 $^{\circ}$ C-5분(초기변성), 94 $^{\circ}$ C-30초(변성, denaturation), 63 $^{\circ}$ C-1분(결합반응, annealing), 72 $^{\circ}$ C-1분(연장반응, extension)으로 25회 증폭 후 72 $^{\circ}$ C-10분(재연장반

응, re-extension)으로 마쳤으며, Fc receptor II (FcR II)의 발현은 94 $^{\circ}$ C-5분(초기변성), 94 $^{\circ}$ C-1분(변성, denaturation), 57 $^{\circ}$ C-1분(결합반응, annealing), 72 $^{\circ}$ C-1분(연장반응, extension)으로 33회 증폭 후 72 $^{\circ}$ C-10분(재연장반응, re-extension)으로 마쳤다. PCR 반응 산물은 GelRed<sup>TM</sup>(Biotium Co., Hayward, CA, USA)를 포함한 1% agarose gel 상에서 전기 영동한 후 Gel-doc system(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)에서 증합효소 반응 띠의 밝기를 정량하였다.

### 8. 통계처리

실험결과는 IBM SPSS statistics 21(IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며, 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 시료 간 및 처리 농도 간 유의적인 차이는  $p < 0.05$  수준에서 Duncan' test 일원배치 분산분석으로 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 간장 유래 다당의 화학적 특성

상업용 간장과 재래식 간장에서 추출한 다당의 화학적 특성은 저자들에 의해 발표된 Park 등(2012)의 보고와 동일 결과로써 Table 1에 나타난 바와 같다. 상업용 간장에서 얻어진 다당(CSP-0)은 중성당 64.2%, 산성당 35.8%으로 구성되어 있으며, 재래식 간장 유래 다당(KTSP-0)은 중성당 73.5%, 산성당 25.5%으로 구성되어 있었다. KTSP-0는 자연계에서 거의 발견되지 않는 특이당인 Kdo(2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid)가 미량 검출되었다. 또한 CSP-0 및 KTSP-0를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과, 두 종류의 시료 모두 9종의 구성당이 분석되었으며, KTSP-0에서 상대적으로 산성당의 함량이 낮게 나타났다.

### 2. 간장 유래 다당의 RAW 264.7 세포에 대한 영향

대식세포는 탐식세포라고도 하며, 인체의 모든 조직에 분포하여 면역계에 중요한 역할을 담당하는 선천면역계의 대표적인 세포이다(Cao 등 2008). 체내로 침입한 바이러스, 세균 등에 의해 활성화 되면 식세포작용(phagocytosis)을 통해 잠재적인 병원체를 제거하며(Ripoll 등 2008), 면역매개물질(inflammatory mediators)을 분비하거나 T 세포의 활성화를 유도하는 등 면역반응 활성화에 기여한다(Jiang 등 2008). 또한, 활성화된 대식세포는 cytokine을 생산하여 비정상 세포, 세포 노폐물, 세포내 세균 등을 제거하는데 중요한 역할을 하며, Class II MHC protein을 세포 표면에 발현하여 보조 T세포와 상호 활성화를 이루기도 한다(Jiang 등 2008). 따라서 대식세포는 탐식작용 뿐만 아니라, 외부 항원을 대식세포 표면에

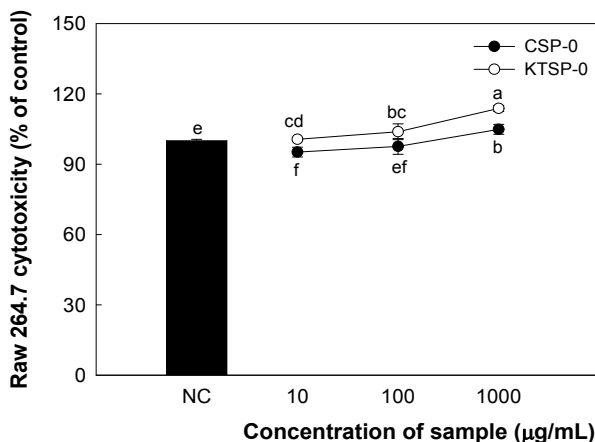
**Table 1. Yields and chemical properties of CSP-0 and KTSP-0 isolated from Korean's commercial and traditional soy sauces**

Chemical composition	CSP-0	KTSP-0	(%)
Neutral sugar	64.2±2.7	73.5±3.6	
Uronic acid	35.8±1.7	25.5±0.6	
Protein	-	-	
Kdo-like material <sup>1)</sup>	-	1.1±0.6	
Component sugar <sup>2)</sup>			(Mole %) <sup>3)</sup>
Rhamnose	6.6±0	9.2±0	
Fucose	6.1±0	7.5±0	
Arabinose	4.5±0	2.9±0	
Xylose	15.6±0	12.7±0	
Mannose	10.9±0	18.2±0	
Galactose	18.0±0	15.9±0	
Glucose	2.4±0	7.1±0	
Galacturonic A + Glucuronic A	35.8±1.7	25.5±0.6	
Yield	5.3 g/ℓ	10.7 g/ℓ	

<sup>1)</sup> Kdo means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.

<sup>2)</sup> Monosaccharides were analyzed using alditol acetates.

<sup>3)</sup> Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.



**Fig. 1. Effects of CSP-0 and KTSP-0 on viability of macrophage cell line RAW 264.7.** CSP-0 and KTSP-0 were isolated from Korean's commercial and traditional soy sauces, respectively. All cells were incubated with various concentrations of CSP-0 or KTSP-0 for 3 days. The cytotoxic response of these cells was measured by a cell counting kit-8. Data were expressed as % control and represented mean±SD of three separate experiments.

부착시켜 후천성 면역계 세포가 항원을 인식할 수 있도록 도와주는 antigen-presenting cell(APC)로서의 역할도 수행한다 (Unanue ER 1984).

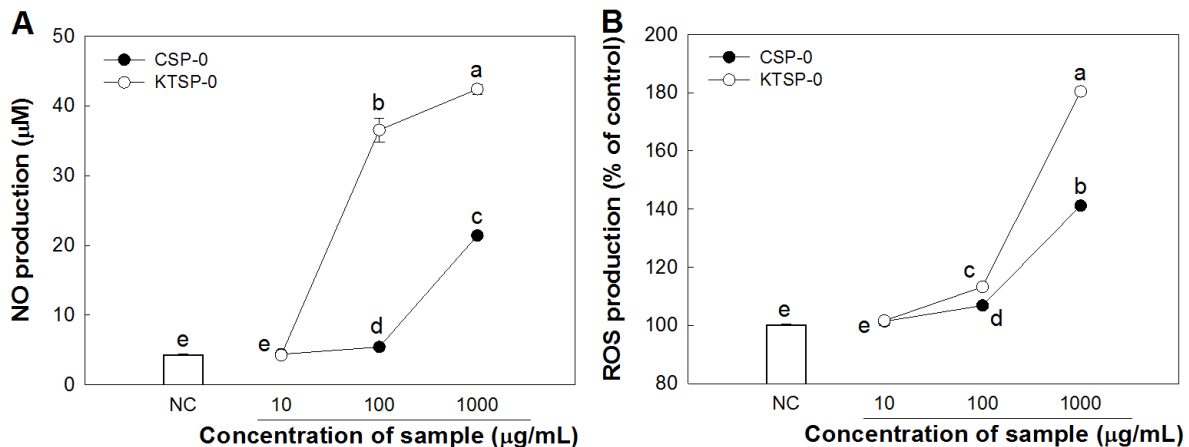
상업용 간장 및 재래식 간장으로부터 분리한 다당이 RAW 264.7 세포에 미치는 영향을 확인한 결과(Fig. 1), CSP-0 및 KTSP-0는 모두 처리농도 10~1,000 µg/ml에서 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 나타내지 않았으며, 특히 재래식 간장에서 분리한 다당(KTSP-0)은 1,000 µg/ml 처리 시 약간의 세포증식 효과가 있는 것을 확인하였다.

### 3. RAW 264.7 세포의 NO, ROS 생산에 미치는 간장 유래 다당의 효과

nitric oxide(NO)는 반응성이 높은 자유 라디칼 중의 하나로, 산소나 superoxide에 의해 N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, nitrite 및 nitrate 등의 안정한 nitrogen oxide로 전환된다(Gross & Wolin 1995). NO는 NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 세포 내의 L-arginine으로부터 만들어지며, 체내 항상성 유지를 위한 endothelial NOS(eNOS)와 neuronal NOS(nNOS), 염증성 인자에 의해 생산되는 inducible NOS(iNOS)로 분류된다(Stuehr DJ 1999). 특히 iNOS에 의해 생산되는 NO는 외부로부터 유입된 병원체로부터 인체를 방어하는데 중요한 역할을 하며, 순환계 질환, 염증 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Kroncke 등 1998; Ohshima & Bartsch 1994).

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세포 내에서 생산되는 물질로, 인체 내로 바이러스나 세균 등의 각종 병원체 및 외부물질이 침입하면 다양한 면역 염증반응을 유발한다. 그 중 대식세포의 산화분출(oxidative burst)은 병원체를 제거하는데 효과적인 방법으로, 대식세포의 ROS 생산 증가는 이러한 외부물질을 제거하기 위한 중요 기전으로 설명되고 있다(Newman SL 1999; Guinazu 등 2010). 또한 ROS는 인체 내부에서 발생하는 세포 노폐물 및 비정상 세포를 제거하는 역할과 T 세포와 관련된 자가 면역질환을 방어한다고 보고되고 있다(Hultqvist 등 2005; Hultqvist 등 2006; Gelderman 등 2007a; Gelderman 등 2007b; Hultqvist 등 2007).

상업용 간장 및 재래식 간장 유래의 다당을 다양한 농도로 처리하여 RAW 264.7 세포의 NO 생산능을 측정된 결과, CSP-0는 1,000 µg/ml 처리 시 대조군보다 NO 생산이 약 5배 증가하였으나(Fig. 2A), 그 이하의 농도에서는 유의적인 차이가 없었다. 반면, KTSP-0의 경우, 100 µg/ml 처리 시 대조군보다 약 9배, 1,000 µg/ml 처리 시 약 10배 증가하여 농도 의존적으로 NO 생산이 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 ROS의 생산능(Fig. 2B)은 CSP-0 및 KTSP-0 모두 대식세포로부터 ROS 생산을 증가시켰다. 그러나 CSP-0는 1,000 µg/ml 처리 시 대조군보다 약 1.4배 증가한 반면, KTSP-0는 1,000 µg/ml 처리 시 약



**Fig 2.** Effects of CSP-0 and KTSP-0 on production of nitric oxide, NO (A) and reactive oxygen species, ROS (B) by macrophage cell line, RAW 264.7. CSP-0 and KTSP-0 were isolated from Korean's commercial and traditional soy sauces, respectively. All cells were incubated with various concentrations of CSP-0 or KTSP-0 for 24 hr. The level of NO in the supernatants was determined by Griess reagent. ROS was measured by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate in the intracellular ROS. The data were expressed as mean±SD of three separate experiments.

1.8배 증가하여 KTSP-0가 ROS 생산에 우수한 영향을 미치는 것으로 검토되었다. 이러한 결과를 통해 재래식 간장 유래 다당(KTSP-0)은 상업용 간장 유래 다당(CSP-0)보다 대식세포로부터 NO와 ROS의 생산을 유도하여 면역기능 활성화에 기여할 가능성이 있음이 추정되었다.

#### 4. RAW 264.7 세포의 IL-6, TNF- $\alpha$ mRNA 발현 및 생산능 측정

면역세포로부터 분비되는 다양한 cytokine은 타 면역세포의 기능조절과 신호전달에 중요한 역할을 하는 용해성 단백질로, 면역세포 간의 복잡한 cytokine network를 형성하여 면역계 전체의 반응 및 효율화에 공헌한다고 알려져 있다(Starr 등 1997). 또한, TLR(toll like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 대식세포를 활성화하여 T세포와 B세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있다(Wang 등 2003). IL-6는 감염과 조직손상에 따른 면역 초기반응에서 생산되는 주요한 반응 매개물질로 IL-1, TNF- $\alpha$  등에 의해 IL-6의 유전자 발현이 자극되어 단핵세포, 대식세포, 간질 세포 등에 의해 생산되며, 급성 염증 반응 촉진 또는 억제하는 것으로 알려져 있다(Hamilton & Adams 1987). 또한 TNF- $\alpha$ 는 림프구에 의해 생산되는 염증 매개성 cytokine으로, 생체 면역반응에서 단독적 혹은 IL-1 등과 같은 cytokine과 복합적으로 작용하여 종양의 혈관을 손상시켜 결과적으로 종양 괴사를 유발하거나 미생물에 의한 감염 저항성을 향상시

킨다고 보고되어 있다(Visner 등 1990).

RAW 264.7 세포에 간장 유래 다당을 처리하여 RNA를 추출, real-time PCR을 수행하여 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생산과 관련된 mRNA의 발현량을 측정하였으며 세포 배양액 내의 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생산을 확인하였다. 상업용 간장 유래 다당 CSP-0는 1,000  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 IL-6 mRNA의 발현량이 음성 대조군에 비해 약 9.7배 증가하였으나, 이하의 농도에서는 뚜렷한 발현량 증가가 확인되지 못했으며(Fig. 3A), TNF- $\alpha$  mRNA의 발현량은 모든 농도에서 유의적인 차이를 확인하지 못했다(Fig. 3B). 하지만 KTSP-0는 IL-6 mRNA 발현량이 대조군에 비해 100  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 약 18배 증가하였고, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 약 63배 증가하는 높은 발현량 증가를 나타내었으며, TNF- $\alpha$  mRNA의 발현량 또한 100  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 약 25배, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 약 71배 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 mRNA의 발현량 변화를 통해 KTSP-0는 LPS와 같이 대식세포의 TLR에 반응하여 cytokine 생산에 관련된 유전자를 발현시켜 최종적으로 cytokine 생산을 유도할 것으로 예상되었다.

이러한 가설은 ELISA를 이용해 간장 유래 다당의 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생산 활성을 측정된 결과, CSP-0는 IL-6의 생산에 유의적인 영향을 미치지 않았지만, KTSP-0의 경우 농도의존적으로 IL-6의 생산이 증가하였으며, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 양성 대조군에 준하는 생산을 유도하였으며, 동일 농도의 CSP-0보다 약 32.1배 높은 생산을 유도하였다(Fig. 3C). TNF- $\alpha$  또한 CSP-0는 1,000  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 TNF- $\alpha$ 의 생산을 유도하였지만, 그 효과는 미미하였다. 반면에 KTSP-0는 농도의존적으로 TNF- $\alpha$ 의 생산이 증가하였으며, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 동일 농

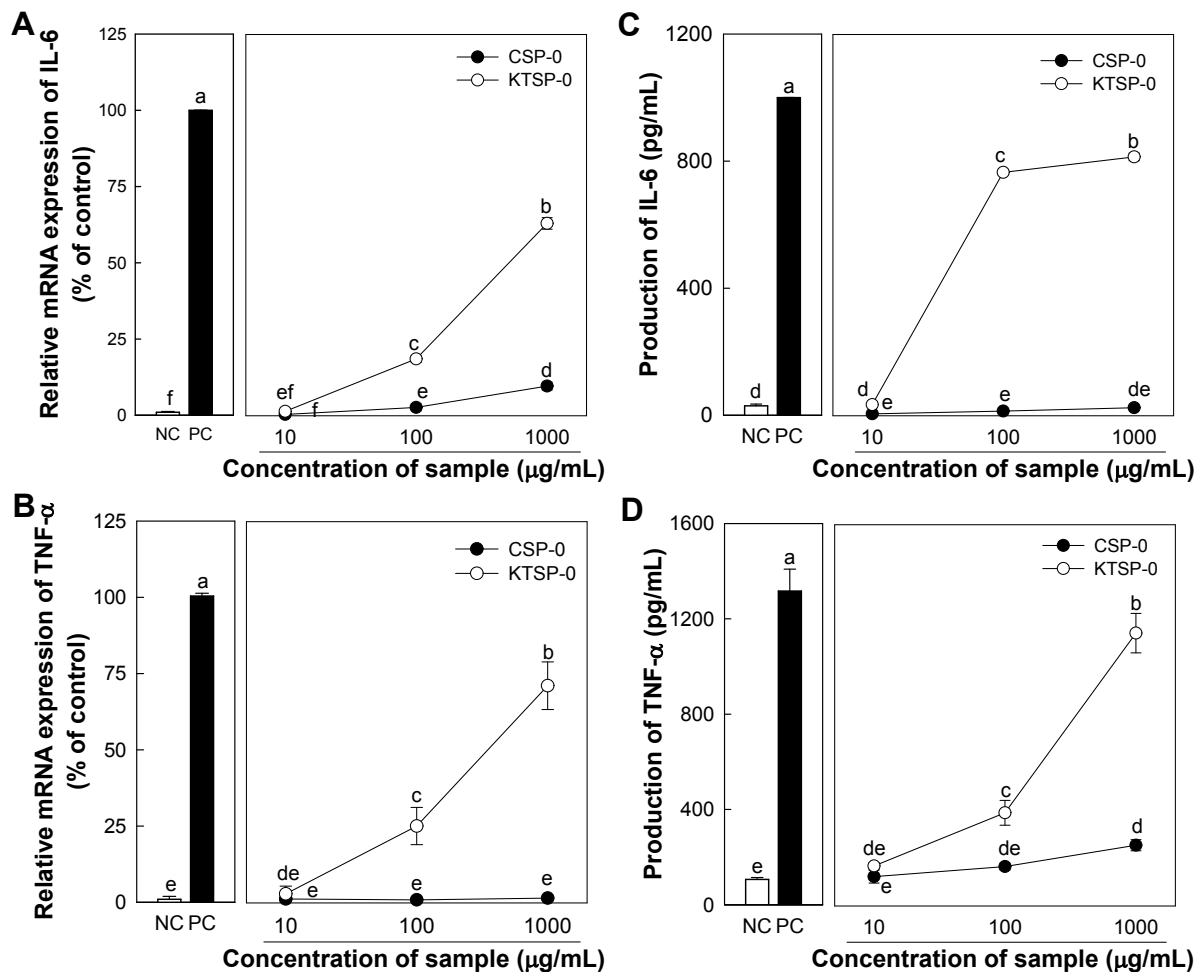


Fig. 3. Effects of CSP-0 and KTSP-0 on mRNA expression (A, B) and production (C, D) of IL-6 and TNF- $\alpha$  by macrophage cell line, RAW 264.7. IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expression level of CSP and KTSP-0 were determined by real-time PCR. Also, the production of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the supernatants of the cultures were determined by ELISA kits. LPS (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as the positive control. The data were expressed as mean $\pm$ SD of three separate experiments.

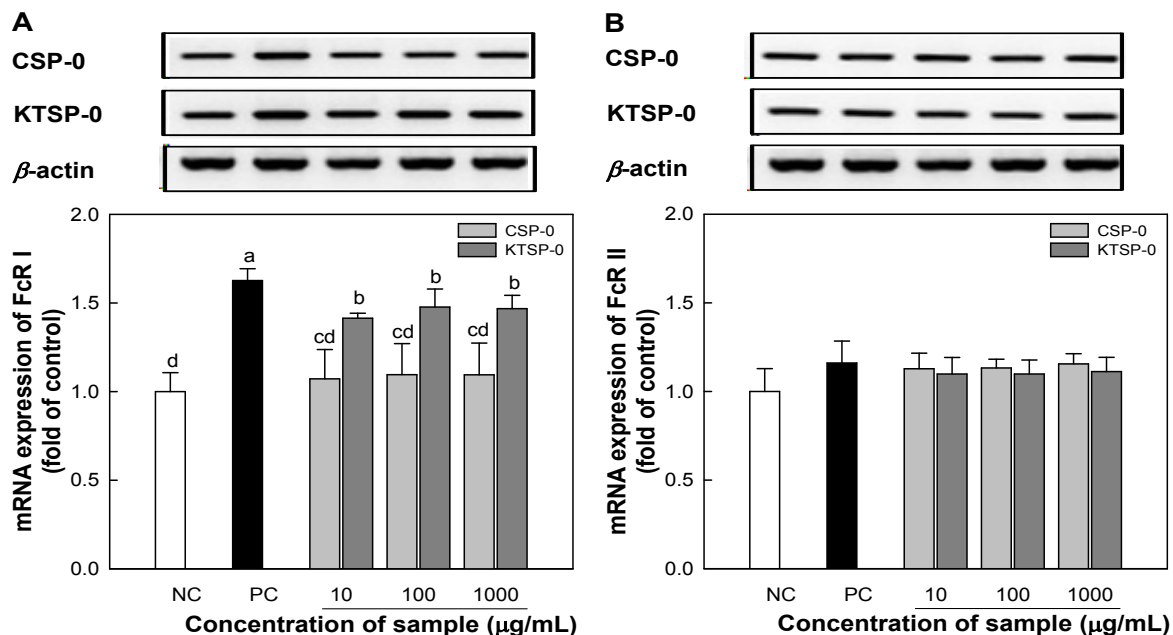
도의 CSP-0보다 약 4.5배 높은 생산을 유도하였다(Fig. 3D). 본 실험을 통해 대식세포를 간장 유래 다당에 의해 자극한 결과, 재래식 간장에서 분리한 다당 KTSP-0는 염증부위에 면역세포의 귀소 및 NO, ROS 생산과 관련이 있는 cytokine인 IL-6와 종양 괴사 유발 및 감염 저항성 향상과 관련이 있는 TNF- $\alpha$ 를 유의하게 생산하는 활성을 가지고 있으며, 생체방어에 작용하는 면역기구의 활성 및 조절에 관여할 수 있다는 가능성을 제시하였다.

##### 5. RAW 264.7 세포의 Fc 수용체 I, II 유전자 발현 측정

간장 유래 다당은 대식세포를 활성화시켜 NO, ROS 및 염증성 cytokine의 생산을 유도할 뿐만 아니라, 대식세포의 Fc 수용체의 발현량을 증가시켜 탐식작용을 유도할 것이라 예상되었다. 대식세포는 혈청 내의 항체와 보체에 의해 수용체가

발현되면서 탐식세포로서의 역할을 하게 된다(Indik 등 1995). Fc 수용체(Fc receptor, FcR)는 대식세포의 수용체와 관련된 식세포작용(phagocytosis)에서 중요한 역할을 담당하는 수용체 중 하나로, 항원에 결합한 Immunoglobulin G(IgG)의 Fc 부분을 인식하여 항원-항체 복합체를 탐식세포에 부착시키는 opsonin 작용을 유도한 후, phagosome을 형성하고, 탐식세포 내의 lysosome에 의한 식세포작용이 이루어지게 한다(Indik 등 1995; Nimmerjahn 등 2005; Nimmerjahn & Ravetch 2006; Nimmerjahn & Ravetch 2007). FcR I은 마우스의 IgG2a와 사람의 IgG1, IgG3와 강하게 결합하는 것으로 알려져 있으며, FcR II는 IgG와 친화성이 약해 결합을 촉진하기 위한 다양한 면역 복합체를 요구한다고 보고되어 있다(Nimmerjahn & Ravetch 2006).

RAW 264.7 세포에 간장 유래 다당을 다양한 농도로 처리



**Fig 4.** Effects of CSP-0 and KTSP-0 on expression of Fc receptor I (A) and II (B) from macrophage cell line, RAW 264.7. Fc receptor I and II mRNA expression level of CSP and KTSP-0 were determined by RT-PCR. RT-PCR products from negative control (NC), positive control (PC), CSP-0 and KTSP-0 stimulated macrophage were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis. The data were expressed as mean±SD of three separate experiments.

한 후 RNA를 추출하고, RT-PCR을 수행하여 Fc 수용체 I, II (FcR I, II)의 발현량 증가를 측정된 결과, FcR I의 경우 CSP-0는 대조군과 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 반면, KTSP-0는 모든 처리 농도에서 FcR I의 발현량을 유의적으로 증가시켰으며, 1,000 µg/ml 처리 시 대조군보다 약 1.5배 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 한편, FcR II의 발현량은 두 다당 모두 유의적인 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 이를 통해 KTSP-0는 IgG와 강하게 결합하는 FcR I을 통해 외부로부터 유입된 바이러스, 세균 등을 탐식하여 면역증진효과를 유도할 것이라 예상할 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 일본식으로 제조된 상업용 간장과 우리나라 전통방식으로 제조된 재래식 간장으로부터 다당을 분리하여 RAW 264.7 대식세포주를 이용한 면역 증진활성을 비교하였다. 간장 유래 다당, CSP-0 및 KTSP-0는 RAW 264.7 세포주에 대해 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 또한 재래식 간장 유래 다당인 KTSP-0는 상업용 간장 유래 다당 CSP-0보다 대식세포에 의한 NO 및 ROS의 생산을 농도의존적으로 증가시켰으며, KTSP-0를 1,000 µg/ml 처리하였을 시 가장 높은 생산능을 나타내었다. 간장 유래 다당의 RAW 264.7 세포로부터 면역반응에 중요한 cytokine인 IL-6와 TNF-

α의 cytokine mRNA의 발현량과 해당 단백질의 생산을 각각 real-time PCR과 ELISA로 확인한 결과, CSP-0는 IL-6와 TNF-α mRNA의 발현 및 생산에 유의적인 영향을 미치지 않았지만, KTSP-0는 농도의존적으로 IL-6와 TNF-α mRNA 발현 및 생산을 증가시키는 것을 확인하였으며, 1,000 µg/ml 처리 시 최대 활성을 보였다. 한편, 대식세포의 탐식작용에서 중요한 역할을 하는 Fc 수용체의 발현 증가를 RT-PCR로 확인한 결과, CSP-0는 FcR I, II의 발현에 모두 영향을 미치지 않았지만, KTSP-0는 FcR I의 발현을 선택적으로 증가시키기가 확인되어 항원에 결합한 IgG와 강하게 결합하여 탐식작용을 촉진시킬 것으로 예상되었다. 본 연구를 통해 상업용 간장에서 분리한 다당, CSP-0보다 우리나라 전통 재래식 간장에서 분리한 다당, KTSP-0가 대식세포를 활성화하여 높은 면역 증진 효과를 나타내는 것으로 결론 지을 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 2012학년도 경기대학교 대학원 연구장학생 장학금 지원에 의하여 수행되었음.

## References

Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL,



- Malinarich F, Hermoso MA. 2007. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 40: 97-112
- Benjamin H, Storkson J, Nagahara A, Pariza MW. 1991. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res* 51:2940-2942
- Booth JS, Nichani AK, Benjamin P, Dar A, Krieg AM, Babiuk LA, Mutwiri GK. 2007. Innate immune responses induced by classes of CpG oligodeoxynucleotides in ovine lymph node and blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 115:24-34
- Cao H, Urban JF, Anderson RA. 2008. Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti- and proinflammatory and glucose transporter gene expression in mouse macrophages. *J Nutr* 138:833-840
- Gelderman KA, Hultqvist M, Olsson LM, Bauer K, Pizzolla A, Olofsson P, Holmdahl R. 2007. Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal* 9:1541-1567
- Gelderman KA, Hultqvist M, Pizzolla A, Zhao M, Nandakumar KS, Mattsson R, Holmdahl R. 2007. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J Clin Invest* 117:3020-3028
- Gross SS, Wolin MS. 1995. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57:737-769
- Guinazu N, Carrera-Silva EA, Becerra MC, Pellegrini A, Albesa I, Gea S. 2010. Induction of NADPH oxidase activity and reactive oxygen species production by a single *Trypanosoma cruzi* antigen. *Int J Parasitol* 40:1531-1538
- Hamilton TA, Adams DO. 1987. Molecular mechanism of signal transduction in macrophage. *Immunol Today* 8:151-158
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5:971-974
- Hultqvist M, Backlund J, Bauer K, Gelderman KA, Holmdahl R. 2007. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunol* 179:1431-1437
- Hultqvist M, Holmdahl R. 2005. Ncf1 (p47phox) polymorphism determines oxidative burst and the severity of arthritis in rats and mice. *Cell Immunol* 233:97-101
- Hultqvist M, Olofsson P, Gelderman KA, Holmberg J, Holmdahl R. 2006. A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS Med* 3:e348
- Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. 1995. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86:4389-4399
- Jiang HL, Kang ML, Quan JS, Kang SG, Akaike T, Yoo HS, Cho CS. 2008. The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization. *Biomaterials* 29:1931-1939
- Kataoka S, Liu W, Albright K, Storkson J, Pariza M. 1997. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia and reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in human polymorphonuclear leucocytes by flavour components of Japanese-style fermented soy sauce. *Food Chem Toxicol* 35: 449-457
- Kinoshita E, Yamakoshi J, Kikuchi M. 1993. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1107-1110
- Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 44:143-161
- Kobayashi M, Matsushita H, Yoshida K, Tsukiyama R, Sugimura T, Yamamoto K. 2004. *In vitro* and *in vivo* anti-allergic activity of soy sauce. *Int J Mol Med* 14:879-884
- Kobayashi M, Nagatani Y, Magishi N, Tokuriki N, Nakata Y, Tsukiyama R, Imai H, Suzuki M, Saito M, Tsuji K. 2006. Promotive effect of *Shoyu* polysaccharides from soy sauce on iron absorption in animals and humans. *Int J Mol Med* 18:1159-1163
- Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113: 147-156
- Lee JG, Kwon KI, Choung MG, Kwon OJ, Choi JY, Im MH. 2009. Quality analysis on the size and the preparation method of *Meju* for the preparation of Korean traditional soy sauce (*Kanjang*). *J Appl Biol Chem* 52:205-211
- Lingen MW. 2001. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 125:67-71
- Masuda S, Hara-Kudo Y, Kumagai S. 1998. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in soy sauce, a fermented seasoning. *J Food Prot* 61:657-661
- Matsumoto T, Cyong JC, Kiyohara H, Matsui H, Abe A, Hirano M, Danbara H, Yamada H. 1993. The pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L. enhances immune-complexes binding to peritoneal macrophages through Fc receptor



- expression. *Int J Immunopharmacol* 15:683-693
- Matsushita H, Kobayashi M, Tsukiyama R, Fujimoto M, Suzuki M, Tsuji K, Yamamoto K. 2008. Stimulatory effect of *Shoyu* polysaccharides from soy sauce on the intestinal immune system. *Int J Mol Med* 22:243-247
- Matsushita H, Kobayashi M, Tsukiyama R, Yamamoto K. 2006. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating activities of *Shoyu* polysaccharides from soy sauce. *Int J Mol Med* 17:905-909
- Newman SL. 1999. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Trends Microbiol* 7:67-71
- Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. 2005. Fc $\gamma$  RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23:41-51
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2006. Fc $\gamma$  receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24:19-28
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96:179-204
- Ohshima H, Bartsch H. 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 305:253-264
- Park HR, Lee MS, Jo SY, Won HJ, Lee HS, Lee H, Shin KS. 2012. Immuno-stimulating activities of polysaccharides isolated from commercial soy sauce and traditional Korean soy sauce. *Korean J Food Sci Technol* 44:228-234
- Ripoll VM, Meadows NA, Raggatt LJ, Chang MK, Pettit AR, Cassidy AI, Hume DA. 2008. Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene* 413:32-41
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-921
- Stuehr DJ. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411:217-230
- Tsuchiya H, Sato M, Watanabe I. 1999. Antiplatelet activity of soy sauce as functional seasoning. *J Agric Food Chem* 47:4167-4174
- Unanue ER. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol* 2:395-428
- Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS. 1990. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 265:2856-2864
- 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 macrophages. *Clin Chim Acta* 327:123-128
- Yokotsuka T. 1986. Soy sauce biochemistry. *Adv Food Res* 30:195-329

---

접 수 : 2013년 11월 18일  
 최종수정 : 2013년 11월 25일  
 채택 : 2013년 11월 28일