

## 가시여지잎(*Annona muricata* L.) 에탄올 추출물과 조다당 분획분의 면역활성 비교

김이은 · 이정희<sup>1</sup> · 성낙윤 · 안동현<sup>2</sup> · 변의홍\*

공주대학교 식품공학과, <sup>1</sup>토담(주), <sup>2</sup>부경대학교 식품공학과 · 식품연구소

### A comparative study of the immuno-modulatory activities of ethanol extracts and crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L.

Yi-Eun Kim, Joeng-Hee Lee<sup>1</sup>, Nak-Yun Sung, Dong-Hyun Ahn<sup>2</sup>, and Eui-Hong Byun\*

Department of Food Science and Technology, Kongju National University

<sup>1</sup>Teodam

<sup>2</sup>Department of Food Science&Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University

**Abstract** This study compared the immuno-modulatory effects of ethanol extracts (*A. muricata* L. ethanol extracts, ALE) and crude polysaccharide fraction (*A. muricata* L. crude polysaccharide fraction, ALP) from *Annona muricata* L. in macrophages. Immuno-modulatory activity was determined by assessing cell viability, nitric oxide (NO) production, inducible NO synthase (iNOS) expression and cytokine production in RAW 264.7 a macrophage cell line. Both ALE and ALP treatment did not affect cytotoxicity, and ALP treatment significantly increased NO production. Additionally, cytokine production [tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ; 2909.04 $\pm$ 4.1 pg/mL), interleukin (IL)-6; 662.84 $\pm$ 5.3 pg/mL, and IL-1 $\beta$ ; 852.37 $\pm$ 2.2 pg/mL], was highly increased in the ALP (250  $\mu$ g/mL) treated group compared to the ALE (250  $\mu$ g/mL) treated group (TNF- $\alpha$ ; 1564.50 $\pm$ 6.1 pg/mL, IL-6; 517.24 $\pm$ 4.1 pg/mL and IL-1 $\beta$ ; 237.23 $\pm$ 1.8 pg/mL). Moreover, ALP treatment considerably increased the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPKs) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the macrophages. Therefore, ALP can induce macrophage activation through MAPK and NF- $\kappa$ B signaling and this can be a potential candidate for development of nutraceuticals.

**Keywords:** *Annona muricata* leaves, crude polysaccharide fraction, immuno-modulatory activity, macrophage activation, nitric oxide production, cytokine production, mitogen-activated protein kinase

## 서 론

가시여지(*Annona muricata*)는 목련목 포포나무과(Magnoliales: Annonaceae)에 속하고, 멕시코, 쿠바, 중앙아메리카, 카리브제도에 주로 자생하며 껍질, 씨앗, 잎 및 등을 전통약재로 음용해 왔다. 특히 아프리카 지역에서는 방광염, 당뇨병, 두통, 고혈압, 불면증, 간 질환, 염증, 경련, 및 피부질환에 개선에 이용해온 것으로 보고되어진다(1). 가시여지는 생리활성물질인 플라보노이드, 테르페노이드, 탄닌, 스테아르산을 다량 함유하고 있으며, 가시여지 추출물은 쥐의 췌장에서 분리한 B cells의 보호에 의한 항당뇨 효과(2), 간내 산화적 손상을 억제 및 방지 할 수 있는 항산화 활성 효과(3), 간암세포의 G1 세포 주기 정지 및 미토콘드리아 매개 경로를 통한 세포사멸 유도에 의한 항암효과가 있다고 보고되어 있다(4). 그러나 기연구된 결과들은 유기용매를 사용하여 추

출한 분획물에 관한 연구들이며, 가시여지 조다당 추출물의 연구는 전무후무한 실정이다.

최근 식물에서 분리된 다당류가 넓은 범위의 생물·의학적 분야에서 낮은 독성으로 인해 주목을 받고 있다. 식물의 다당류는 보체 및 큰포식세포 등의 활성을 통해 면역증진, 항암 효과를 높게 증가시키는 것으로 보고되어지며, 또한 선천면역계의 조절을 통해 인체내로 침투한 병원균을 강력하게 제거하는데 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(5). 또한 약용식물에서 분리한 다당류들은 마우스에서 적출한 비장세포 증식 및 B림프구의 활성 효과 증가(6), 큰포식세포의 면역활성 매개 물질인 산화질소(nitric oxide; NO) 및 사이토카인(cytokine)의 분비를 증가시켜 면역세포의 활성을 유도한다는 것으로 보고되었다(7).

면역반응은 자기방어체제로 외부로부터 유입된 병원성 항원으로 부터 우리 몸을 보호하기 위한 수단으로 작용 되는데 이러한 면역계는 다양한 면역세포들의 상호 작용으로 그 체계가 유지된다. 이들 중 큰포식세포는 자기(self) 및 비자기(non-self)를 인식하여 외부로부터 유입된 병원성 항원을 포식하거나, 감염된 세포 및 노화된 세포를 제거하고, 항상성을 유지하여, 면역계에서 중요한 역할을 하는 세포이다(8). 큰포식세포는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 유도된 면역조절인자 산화질소와 종양 괴사인자(tumor necrosis factor; TNF- $\alpha$ ), 인터루킨(interleukin-6; IL-6), IL-1 $\beta$  및 pro-inflammatory 사이토카인 등을 분비하여 면역

\*Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan, Chungnam 32439, Korea

Tel: +82 41 330 1481

Fax: +82 41 330 1489

E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr

Received March 28, 2017; revised May 16, 2017;

accepted May 22, 2017

체계를 유지하며, 이러한 면역반응은 mitogen activated protein kinases (MAPKs)와 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 등과 같은 신호 전달계의 활성을 통하여 조절된다(9).

본 연구는 가시여지 잎에서 분리한 에탄올 추출물(ethanol extracts; ALE)과 조다당 분획물(crude polysaccharide fraction; ALP)의 면역 활성에 관하여 비교하기 위해 선천 면역계의 중심의 기능을 하는 마우스 기원의 큰포식세포주인 RAW 264.7에 ALE, ALP를 처리하여 면역조절 물질인 사이토카인, iNOS 단백질 발현 및 산화질소의 분비능을 조사하였으며, 정확한 신호전달 체계를 알아보기 위해 MAPKs의 인산화와 NF- $\kappa$ B의 발현 등에 미치는 영향에 관하여 관찰해 보았다.

## 재료 및 방법

### 가시여지 잎 에탄올 추출물(ALE), 및 조다당 분획물(ALP)의 제조

본 연구에서 사용된 가시여지 잎은 (주)토담에서 제공받아 사용하였다. 건조된 가시여지 잎을 실험실용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여, 가시여지 잎 분말 50 g에 400 mL의 Distilled Water (DW)를 가하여 100°C에서 2시간 동안 열수추출 하였다. 추출물을 거름종이(No. 4, Whatman, Kent, UK)로 여과 후, 여과액에 70% 에탄올을 가하여 4°C에서 12시간 동안 방치한 후, 원심분리(3,200 rpm, 20분)하여 침지된 조다당(ALP)을 분리하고, 이를 냉동건조하여 실험에 사용하였다. 가시여지 잎 에탄올 추출물을 얻기 위하여 가시여지 잎 분말 50 g에 에탄올 1 L를 넣고 상온에서 24시간 동안 교반하여 얻은 추출물을 원심분리 한 후 상층액을 취하고, 감압농축기로 농축한 뒤 동결 건조하여 가시여지 잎 에탄올 추출물(ALE)로 사용하였다.

### 내독소 함량 평가

에탄올 추출물 및 조다당 분획물의 내독소 함량은 Limulus Amebocyte Lysate assay kit (GenScript, Piscataway, NJ, USA)을 구입하여 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 내독소 함량은 15 pg/mL (0.1 EU/mL) 이하로 측정되었다.

### 세포배양

마우스 기원의 큰포식세포주인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 배양을 위해 100 unit/mL 페니실린(penicillin) 및 100 unit/mL 스트렙토마이신(streptomycin)과 10% 소태아혈청(Fetal bovine serum: FBS)를 포함하는 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지(Life Technology, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기(Thermo, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

### 세포 생존율 평가

RAW 264.7 cell을 96 well plate에  $3 \times 10^4$  cell/well의 농도로 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고 ALE 및 ALP를 PBS (Phosphate Buffered Saline, WelGene, Daegu, Korea)에 용해하여 31.25, 62.5, 125, 및 250  $\mu$ g/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였다. Well당 30  $\mu$ L의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액(5 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT시약의 첨가로 형성된 포마잔(formazan)을 녹이기 위해서 다이메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO, Sigma)를 100  $\mu$ L씩 첨가하고 1시간

후 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

### 사이토카인 분비 유도능 평가

96 well plate에 RAW 264.7 cell을  $3 \times 10^4$  cell/well로 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, PBS에 용해된 ALE 및 ALP (31.25, 62.5, 125 및 250  $\mu$ g/mL) 또는 양성대조구인 지질다당류(Lipopolysaccharide; LPS; 200 ng/mL) 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하고 배양 상층액을 분리하였다. 분리된 배양 상층액에서 종양괴사인자, IL-1 $\beta$  및 IL-6의 함량을 측정하였다. 사이토카인 함량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정 하였으며, 이때 사이토카인의 농도는 kit에 포함되어 있는 표준 용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

### 산화질소 유도능 평가

분리된 배양 상층액 100  $\mu$ L에 동량의 Griess (Sigma) 시약을 처리하여 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화질소의 농도는 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>, Sigma)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

### 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)

RAW 264.7 cell을 6 well plate에  $2 \times 10^6$  cell/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고 ALE 및 ALP를 125 및 250  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 후 NP40 Cell lysis buffer (Biosource, Seoul, Korea)를 첨가한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리해서 cell lysate를 분리하였다. 핵내의 단백질을 분리하기 위하여, 상기 수집된 세포에 저장성 완충액[10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM 염화마그네슘(magnesium chloride; MgCl<sub>2</sub>), 10 mM 염화포타슘(potassium chloride; KCl), 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1  $\mu$ M 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 (EDTA) 0.5 mM DTT, 1  $\mu$ M leupeptin, 0.2 mM PMSF)을 처리하여 10,000 g에서 20분간 원심분리하여 핵 단백질을 추출하였다. 분리된 cell lysate는 BCA protein detection kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질 정량을 실시하였고, well당 20  $\mu$ g의 cell lysate를 10% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에 각각 loading하여 SDS-PAGE로 변성분리 하였다. 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 transfer 하였고, membrane은 anti-body의 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution (skim milk 5%) 20 mL에서 1시간 방치하였다. 이후 Tris buffered saline with Tween-20 (TBST, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며, p-p38, p-ERK, p-JNK 및 NF- $\kappa$ B의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체(Cell signaling, Danvers, MN, USA)를 1:2,000으로 희석하여 4시간 동안 반응시키고, TBST로 5분간 3회 세척하였다. 이후 2차항체(goat anti rabbit IgG, Calbio-chem, La Jolla, CA, USA)를 1:5,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, 현상을 위하여 electro-chemiluminescence (ECL, Millipore Merck KGaA) reagent를 사용하여 인화하였다.

### 통계 분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 One Way ANOVA test로 분석하였으며, 시료간의 유의성은 Student's two tailed *t*-test로 \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, 및 \*\*\**p*<0.001 수준에서 비교하였다.

### 결과 및 고찰

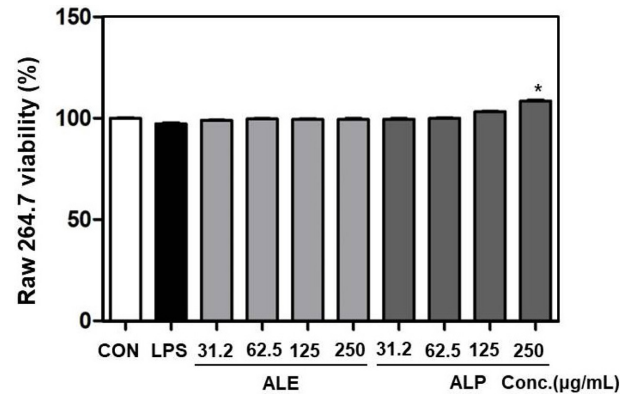
#### ALE 및 ALP의 세포 생존율 평가

ALE 및 ALP가 큰포식세포의 세포독성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 RAW 264.7 cell에 ALE 및 ALP를 처리하여 세포의 생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). ALE 및 ALP를 31.25, 62.5, 125 및 250 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 ALE 및 ALP의 처리는 큰포식세포에 세포독성에 영향을 미치지 않았으며, 추후 ALE 및 ALP의 처리가 사이토카인 및 산화질소의 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 ALE 및 ALP의 농도를 250 µg/mL 이하로 고정하여 실험하였다.

#### ALE 및 ALP의 iNOS 관련 산화질소 생성에 미치는 영향

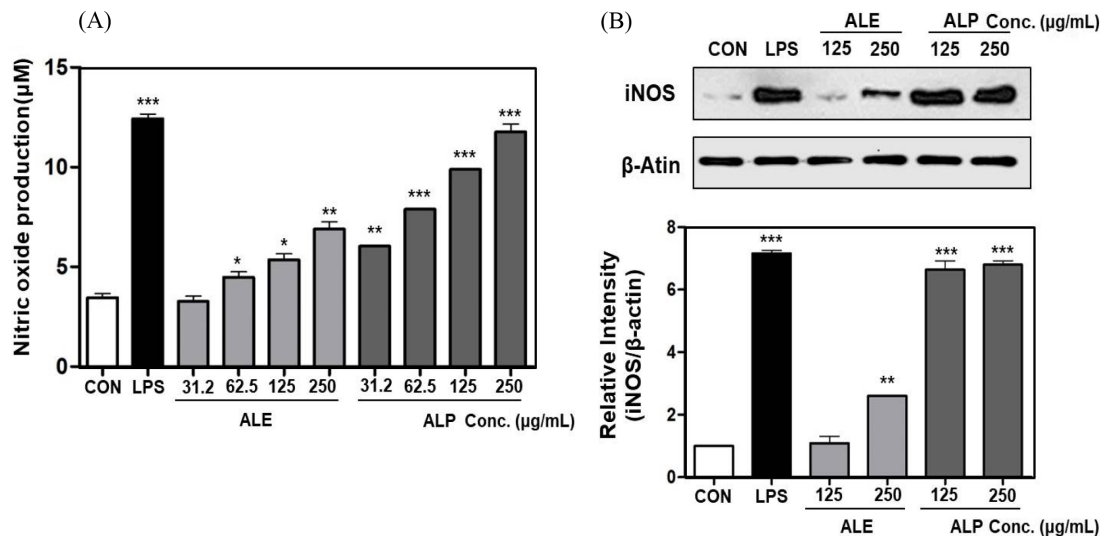
비특이적 항원의 침입에 의해 활성화된 큰포식세포는 항원을 포식하고, 항원에 대한 정보를 후천면역반응에서 주된 역할을 하는 T세포에 제시해 세포매개성 반응의 활성을 유도한다. 활성화된 큰포식세포가 분비하는 산화질소는 L-arginin으로부터 iNOS에 의해 생성되며, 생체 내 감염을 일으키는 항원을 효과적으로 제어하기 위한 수단으로 사용된다(10). 따라서 산화질소분비의 증가는 큰포식세포의 활성화에 관한 바이오-마커(bio-marker)로 주로 사용된다(11-13).

ALE 및 ALP의 처리가 큰포식세포의 활성화에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위해서 마우스 큰포식세포인 RAW 264.7 cell에 ALE 및 ALP를 처리한 후 세포 상층액에서 산화질소 생성에 대

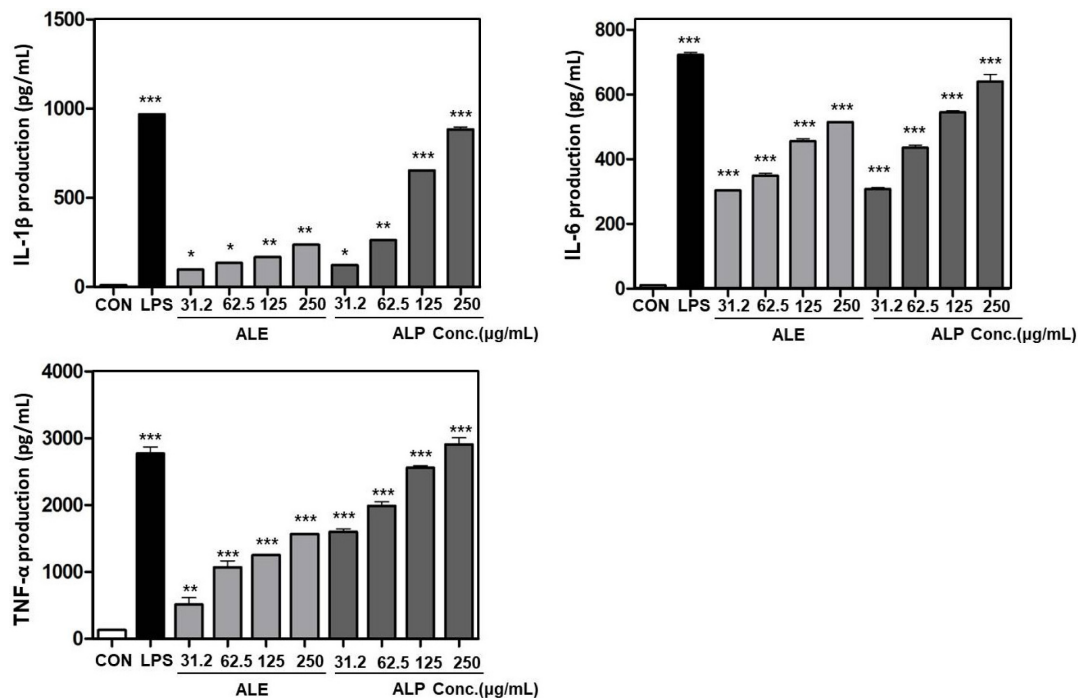


**Fig. 1. Cell viability of macrophage cell line (RAW 264.7) treated with *Annona muricata* L. ethanol extracts (ALE) and crude polysaccharide fraction (ALP).** ALE and ALP were treated at the concentration of 31.2, 62.5, 125, and 250 µg/mL and LPS (200 ng/mL) used as a positive control. After 24 h, cell proliferation was evaluated by MTT assay. Results are expressed as the mean±SD (*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.

해서 알아보았다(Fig. 2A). 양성 대조군인 지질다당류를 처리하여 산화질소 분비능을 관찰한 결과, 지질다당류의 처리에 따라 산화질소 분비능이  $12.43 \pm 0.4$  µM로 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 세포독성에 영향을 미치지 않는 농도인 31.25, 62.5, 125 및 250 µg/mL로 ALE 및 ALP로 처리하여 산화질소의 분비능을 관찰한 결과, ALE 처리하였을 경우  $6.17 \pm 0.2$ ,  $7.14 \pm 0.2$ ,  $8.01 \pm 0.1$ ,  $9.23 \pm 0.1$  µM로 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 ALP 처리하였을 때도  $6.04 \pm 0.1$ ,  $7.89 \pm 0.1$ ,  $9.9 \pm 0.1$ ,  $11.76 \pm 0.5$  µM로 농도 의존적으로 산화질소의 분비능을 증가시키는 것으로 관찰되었다.



**Fig. 2. Nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) expression in macrophage cell line (RAW 264.7) treated with *Annona muricata* L. ethanol extracts (ALE) and crude polysaccharide fraction (ALP).** ALE and ALP were treated at the concentration of 31.2, 62.5, 125, and 250 µg/mL in RAW 264.7 cells. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 200 ng/mL as a specific mitogen to macrophage cells. After 24 h, NO production in culture supernatant was analyzed by Griess reagent assay (A). iNOS expression in cell lysate was investigated by western blotting (B). Results are expressed as the mean±SD (*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.



**Fig. 3.** Cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ) production activity caused by *Annona muricata* L. ethanol extracts (ALE) and crude polysaccharide fraction (ALP) in macrophage cell line (RAW 264.7). ALE and ALP were treated at the concentration of 31.2, 62.5, 125, and 250  $\mu$ g/mL. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 200 ng/mL as a specific mitogen to macrophage cells. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. Results are expressed as the mean $\pm$ SD ( $n=3$ ). 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.

산화질소 생성 증가에 관한 원인에 관하여 알아보기 위하여, 산화질소 생성 관여하는 iNOS 단백질의 세포내 발현에 관하여 관찰하였다(Fig. 2B). ALE 및 ALP를 125 및 250  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 큰포식세포내 iNOS 발현을 관찰한 결과, 산화질소 결과와 유사하게 ALE 및 ALP 모든 처리구 세포내 iNOS의 발현이 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, ALE 및 ALP 처리구의 iNOS 발현량에 관하여 비교해본 결과, ALP 처리구에서 iNOS 발현량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 ALP 처리에 따른 산화질소 분비능의 증가는 세포내 iNOS 발현이 증가에 따른 것으로 사료되며, 이러한 결과로 미루어 보아 가지여지 잎의 다당류 추출물(ALP)은 큰포식세포의 산화질소 분비능을 증가시켜 큰포식세포의 면역활성에 기여하는 것으로 판단된다.

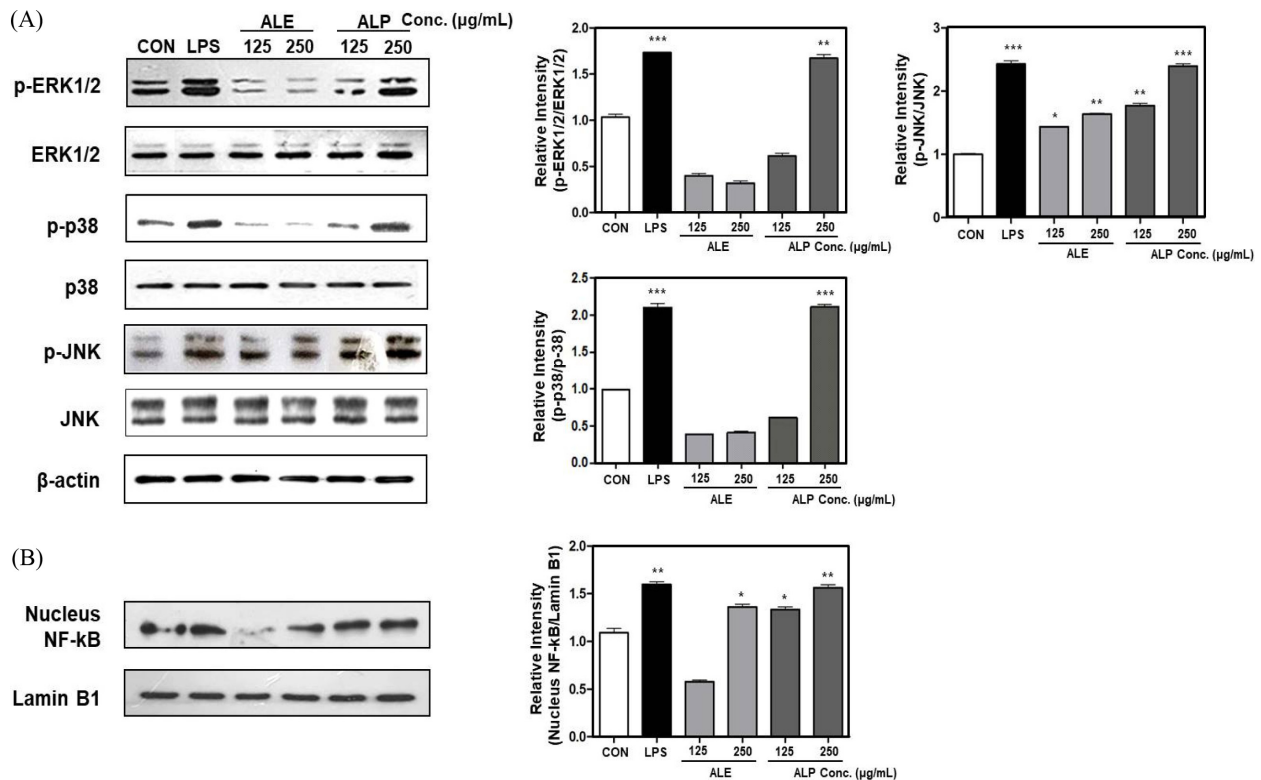
### 사이토카인 분비능

활성화된 큰포식세포는 산화질소 뿐만 아니라 면역반응 시, 면역세포 간 상호작용을 매개하여 면역반응을 조절하는 역할을 수행하는 pro-inflammatroy 사이토카인인 종양괴사인자, IL-6 및 IL-1 $\beta$  등을 분비한다(7). 이 중 종양괴사인자는 큰포식세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로, 종양괴사인자로 작용하고, 외부로부터 유입된 병원체 및 미생물과 같은 항원에 오염된 세포의 살해능력을 증가시켜 숙주 방어 작용을 유도하고, 감염부위를 국소화시켜 초기 면역반응에서 중요한 역할을 수행한다(14).

IL-6는 B 세포와 T 세포의 기능을 조절해 체액성 면역반응을 돕고 조절 작용을 활발하게 일어나게 하며, IL-1 $\beta$ 는 종양괴사인자와 유사하게 외부로 유입된 병원성 항원의 확산을 감소시킴으로써 초기 감염반응의 확대를 감소시키며, B 세포와 T 세포의 분화를 촉진시켜 후천성 면역반응의 개시반응을 빠르게 진행시키는 역할을 수행한다(15,16). 따라서 큰포식세포에서 면역반응의

매개자 역할을 수행하는 사이토카인 분비능의 증가는 초기면역반응에 따른 과도한 염증 발생을 억제하고, B 세포, T 세포의 분화를 촉진시키거나, 그 기능을 조절하여 외부 병원성 항원의 침입에 따른 염증을 억제시키는데 중요한 역할을 수행한다. 본 연구에서 면역활성의 바이오-마커로써 면역체계의 유지 및 보수와 밀접한 연관성을 가지는 사이토카인의 분비능에 관하여 관찰하였다.

ALE 및 ALP를 농도별(31.25, 62.5, 125 및 250  $\mu$ g/mL)로 RAW 264.7 세포에 처리하여 세포 배양 상층액에서 사이토카인(종양괴사인자, IL-6, IL-1 $\beta$ )의 함량을 ELISA법으로 측정 하였다(Fig. 3). 양성대조구인 지질다당류 처리시, 모든 처리구에서 사이토카인(종양괴사인자; 2772.02 $\pm$ 3.8 pg/mL, IL-6; 729.43 $\pm$ 1.3 pg/mL, IL-1 $\beta$ ; 968.2 $\pm$ 2.87 pg/mL)의 분비량이 증가하는 것으로 관찰되었다. ALE 처리구에서 종양괴사인자의 분비량은 512.20 $\pm$ 2.9, 1067.13 $\pm$ 8.8, 1252.54 $\pm$ 2.4 및 1564.50 $\pm$ 6.1 pg/mL로 나타났고, IL-6의 분비량은 302.14 $\pm$ 4.1, 356.21 $\pm$ 5.5, 447.13 $\pm$ 2.4 및 517.24 $\pm$ 4.1 pg/mL로 나타났으며, IL-1 $\beta$ 의 분비량은 97.54 $\pm$ 5.2, 134.21 $\pm$ 1.2, 167.40 $\pm$ 2.1 및 237.23 $\pm$ 1.8 pg/mL로 ALE 처리농도 의존적으로 사이토카인의 분비량이 증가되는 것으로 관찰되었다. 또한 ALP 처리구에서도 종양괴사인자의 분비량이 1597.03 $\pm$ 6.2, 1989.50 $\pm$ 8.7, 2559.54 $\pm$ 3.7 및 2909.04 $\pm$ 4.1 pg/mL로 나타났으며, IL-6의 분비량은 212.02 $\pm$ 8.1, 427.32 $\pm$ 2.4, 549.51 $\pm$ 1.2 및 662.84 $\pm$ 5.3 pg/mL, IL-1 $\beta$ 의 분비량은 122.38 $\pm$ 4.8, 261.67 $\pm$ 2.6, 653.28 $\pm$ 2.5 및 852.37 $\pm$ 2.2 pg/mL로 ALP 처리농도 의존적으로 사이토카인의 분비량이 증가되는 양상이 관찰되었다. 또한 ALE 및 ALP 처리군을 비교하여 볼 때, ALP 처리구에서 모든 사이토카인(종양괴사인자, IL-6, IL-1 $\beta$ )의 함량이 높게 증가하는 경향이 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아, 가지여지 잎의 다당류 추출물(ALP)의 처리는 큰포식세포의 산화질소 분비능을 증가시키는 것뿐만 아니라, 사이



**Fig. 4. Effect of *Annona muricata* L. ethanol extracts (ALE) and crude polysaccharide fraction (ALP) on MAPKs phosphorylation and NF- $\kappa$ B expression in RAW 264.7 macrophage cells.** ALE and ALP were treated at the concentration of 125 and 250  $\mu$ g/mL for 30 min. LPS (200 ng/mL) used as a positive control. MAPKs phosphorylation and NF- $\kappa$ B expression evaluated by western bolt analysis using specific antibodies to JNK, phospho-JNK, p38, phospho-p38, ERK1/2, phospho-ERK1/2 (A) and phospho-NF- $\kappa$ B (B). Results are expressed as the mean $\pm$ SD ( $n=3$ ). 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.

토카인의 분비능을 조절하여 큰포식세포의 면역활성에 기여하는 것으로 판단된다.

#### ALE 및 ALP의 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B의 인산화에 미치는 영향

외부 자극에 의해 면역반응이 유도되면 면역세포 내부의 신호 전달 체계가 활성화 되면서, 산화질소 및 사이토카인등과 같은 면역매개물질들의 분비가 촉진된다. MAPKs (mitogen-activated protein kinase) 및 NF- $\kappa$ B는 면역세포에서 면역활성을 매개하는 대표적인 신호전달 체계이다(17).

MAPKs에 속하는 대표적인 단백질에는 extracellular regulated protein kinase (ERK), c-Jun NH<sub>2</sub>-protein kinase (JNK) 및 serine/threonine protein kinase (p38) 등의 3종이 있으며, 활성화 된 MAPKs는 NF- $\kappa$ B로 면역활성의 신호를 전달하여, 면역세포활성 관련인자들의 단백질 발현 및 세포 소기관에 영향을 주게 된다 (18,19).

일반적으로 NF- $\kappa$ B는 inhibitor of NF- $\kappa$ B (IB) 단백질과 결합하여 불활성화 상태로 세포질에 존재 하는데, 면역 활성 인자들로 부터 IB가 인산화 되면 활성화되어, 핵 내로 이동한다(20). NF- $\kappa$ B가 핵 내로 이동하여 활성화 되면 activator protein-1 (AP-1) 등과 같은 핵 내의 다른 면역 활성인자를 인산화 시키고, 면역 매개 물질들의 유전자 발현을 유도하게 된다. 따라서 면역반응의 신호전달 체계에서 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B의 활성화는 면역반응의 개시, 유지, 발전에 매우 중요한 역할을 수행한다(21).

따라서 본 연구에서 ALE 및 ALP의 처리가 매개하는 면역반응의 메커니즘에 관하여 분석하기 위하여, ALE 및 ALP 처리된

세포내 MAPKs (p38, ERK1/2, 및 JNK)와 NF- $\kappa$ B의 활성화에 관하여 관찰하였다(Fig. 4). 양성제리구인 지질다당류 처리구(200 ng/mL)에서 p38, ERK1/2, JNK의 인산화가 증가되었으며, 핵내 NF- $\kappa$ B의 발현 또한 증가하였다. ALE 및 ALP를 125 및 250  $\mu$ g/mL 농도로 처리한 후, 면역 세포내 MAPKs의 인산화와 핵내 NF- $\kappa$ B의 발현에 관하여 관찰한 결과, ALP 처리구에서 p38, ERK1/2, 및 JNK의 인산화가 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한 핵내 NF- $\kappa$ B의 발현이 MAPKs의 결과와 유사하게 증가되는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 비교 연구에서 다당류 추출물인 ALP 처리구가 ALE 처리구보다 높은 면역활성을 유도하는 것으로 나타났으며, ALP의 처리는 MPAKs의 인산화 및 NF- $\kappa$ B의 핵내 이동성을 증가시켜 높은 면역활성을 유지하는 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 가시여지 잎 에탄올 추출물(ALE) 및 조다당 추출물(ALP)의 면역 활성에 관하여 비교하기 위하여, 선천 및 적응면역에서 중추적인 역할을 수행하는 큰포식세포에 ALE 및 ALP를 처리하여 세포 증식률, 산화질소 분비능, 사이토카인(종양괴사인자, IL-6, IL-1 $\beta$ ) 분비능 및 기전 분석을 통한 신호전달에 관하여 관찰하였다. ALE 및 ALP를 큰포식세포에 처리하여 면역활성에 관하여 비교하였을 때, 큰포식세포 면역활성의 바이오-마커인 산화질소, 사이토카인의 분비능 및 iNOS의 세포내 발현이 ALP 처리구에서 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었으며, 기전분석 결과, ALP의 처리는 MPAKs의 인산화 및 NF- $\kappa$ B의 핵내 이동성



을 증가시켜 면역활성을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 따라서, ALP의 높은 면역활성은 MPAKs의 인산화 및 NF- $\kappa$ B의 활성화와 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다.

## References

1. Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Hajrezaie M, Karimian H, Abdulla MA, Kadir HA. *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. *Int. J. Surg.* 18: 110-117 (2015)
2. Florence NT, Benoit MZ, Jonas K, Alexandra T, Désiré DD, Pierre K, Théophile D. 2013. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 151: 784-790 (2013)
3. Adewole SO, Ojewole JA. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Tradit. Complement.* 6: 30-41 (2008)
4. Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Karimian H, Fadaeinasab M, Firoozinia M, Abdulla MA, Kadir HA. The chemopotential effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect of acetogenin anomuricin E in HT-29 cells: a bioassay-guided approach. *PLoS One* 10: 10-14 (2015)
5. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6: 317-333 (2006)
6. Sim SM, Im GH, Kim JW, Lee UY, Kim HW, Lee MU, Lee TS. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Daedaleopsis tricolor*. *Kor. J. Mycol.* 31: 161-167 (2003)
7. Sung NY, Park YY, Kim YE, Cho EJ, Kim MH, Ryu GH, Byun EH, Park YJ. Immuno-modulatory activities of polysaccharides separated from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* in macrophage cells. *Korean J. Food Nutr.* 29: 431-437 (2016)
8. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 44: 143-161 (2002)
9. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 723-737 (2011)
10. Lee HJ, Lee CW, Choi MS, Son DJ, Hong JT. Effects of esthetic essential oils on LPS-induced nitric oxide generation in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 32: 111-116 (2006)
11. Gao X, Bjork L, Trajkovski V, Uggla M. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J. Sci. Food Agr.* 80: 2021-2027 (2000)
12. Flurkey WH. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J. Food Sci.* 56: 93-95 (1991)
13. Jung DW, Park SI. Effect of green tea powder on the growth inhibition of oral bacteria in yoghurt. *Korean J. Food Sci. An.* 25: 500-506 (2005)
14. Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Cho YJ, Ahn DH. The anti-inflammatory effect of Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) oil in LPS-induced RAW 264.7 cells and mouse models. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 43: 45-55 (2015)
15. Lee JH, Kim YS, Lim EM. Effects of *Angelicae Pubescentis Radix* water extract on immune property in RAW 264.7 macrophages. *J. Korean Orient. Med.* 32: 175-184 (2011)
16. Byun EH. Comparison study of immunomodulatory activity of polysaccharide and ethanol extracted from *Sargassum fulvellum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1621-1628 (2015)
17. Brewer MS, Ikins WG, Harbers CAAZ. TBA values, sensory characteristics, and volatiles in ground pork during long-term frozen storage: effects of packaging. *J. Food Sci.* 57: 558-563 (1992)
18. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25: 7-9 (2000)
19. Caivano M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett.* 429: 249-253 (1998)
20. Kwon DH, Kang HJ, Choi YH, Chung KT, Lee JH, Kang KH, Hyun SK, Kim BW, Hwang HJ. Immunomodulatory activity of water extract of *Ulmus macrocarpa* in macrophages. *J. Life Sci.* 26: 50-58 (2016)
21. Kim SY, Jo MJ, Hwangbo M, Back YD, Jeong TY, Cho IJ, Jee SY. Anti-inflammatory effect of *Stevia rebaudiana* as a results of NF- $\kappa$ B and MAPK inhibition. *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* 26: 54-64 (2013)