

꿀벌 꽃가루 열수 추출물의 큰포식세포 면역활성 효과

김이은¹ · 조은지¹ · 변의홍^{1,2,*}

¹공주대학교 식품공학과, ²공주대학교 식품과학연구소

Immunomodulatory effect of bee pollen extract in macrophage cells

Yi-Eun Kim¹, Eun-Ji Cho¹, and Eui-Hong Byun^{1,2,*}

¹Department of Food Science and Technology, Kongju National University

²Food Science Research Institute, Kongju National University

Abstract Activation of macrophages plays an important role in the host-immune system. In this study, we investigated the functional roles and related signaling mechanism of hot-water extracts of bee pollen (BPW) in RAW 264.7 macrophages. Since BPW did not exert cytotoxicity at concentrations ranging from 62.5 to 250 µg/mL in macrophage cells, a concentration of 250 µg/mL was used as the maximum dose of BPW throughout subsequent experiments. BPW increased inducible nitric oxide synthase-mediated nitric oxide production in a concentration-dependent manner. Additionally, BPW was found to induce macrophage activation by augmenting the expression of cell surface molecules (cluster of differentiation; CD80/86, and major histocompatibility complex; MHC class I/II) and production of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and IL-1 β) through mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B signaling pathways in RAW 264.7 macrophages. Taken together, our results indicate that BPW could potentially be used as an immunomodulatory agent.

Keywords: bee pollen, macrophage, immuno-modulatory activity, cytokine production, mitogen-activated protein kinase

서 론

면역반응은 병원균과 같은 인체로 유입된 외부 항원으로부터 생체를 보호하기 위한 자기방어체계로서 다양한 면역세포들의 상호작용으로 체계가 유지된다. 병원체가 체내에 침입했을 때 가장 먼저 대응하는 면역세포들은 호중구, 단핵구, 큰포식세포와 같은 탐식세포들이 있다(Cha 등, 2014). 이 중 큰포식세포는 바이러스, 곰팡이, 세균 등과 같은 병원성 항원들에 의해 활성화되면 이들을 포식해 침입을 억제하며, 산화질소(II) (nitric oxid, NO)와 염증유발 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)과 같은 면역조절 인자들을 분비하여 선천면역을 매개하는 세포를 활성화하거나 후천면역계에 대표적인 세포인 T 세포에 특이 항원에 대한 정보를 제시해 분화를 조절하여 면역체계를 유지하며, 또한 배아발생, 상처 치유, 감염과 노화된 세포 제거 등을 통해 면역반응에서 중요한 역할을 한다(Byun, 2017; Klimp 등, 2002; Schepetkin과 Quinn, 2006; Sung 등, 2016). 즉, 활성화된 큰포식세포로부터 분비된 면역조절인자인 사이토카인류 들은 자신을 활성화시켜 포식작용을 증강시키거나, 미토겐 활성 단백질 인산화효소(mitogen-activated protein kinases; MAPKs)와 nuclear factor- κ B (NF- κ B)

등과 같은 신호전달계의 활성을 통해 면역반응을 조절한다(Murray 과 Wynn, 2011). MAPKs와 NF- κ B는 다양한 유전자의 발현과 분화 그리고 세포 증식과 같은 면역반응을 중재하는 중요한 역할을 수행하는 인자라고 알려져 있다.

최근 인간의 수명 연장과 건강에 대한 관심이 증가하면서 건강유지를 위한 자연식품의 기능성과 생리활성물질에 대한 연구가 널리 진행되고 있으며, 현재 식품소재 또는 자연물로부터 추출한 물질을 면역조절 물질로서 개발하는 많은 방법들이 제시되고 있다(Byrd 등, 2000; Lee 등, 1998). 이러한 자연물로부터 추출한 물질은 비특이적으로 면역세포들을 자극하여, 면역기능을 활성화시켜 여러 질병요인으로부터 생체의 방어력을 증강시켜 예방한다.

화분은 꿀벌을 유충과 성충의 단백질원으로 탄수화물, 지방질, 바이타민, 호르몬, 무기질 등의 영양성분이 풍부하다(Huang 등, 2017). 특히 벌이 채취한 꿀벌 꽃가루는 꿀과 효소가 혼합되어 있어 일반 화분보다 영양성분이 풍부하여 꿀벌의 단백질과 로열 젤리의 원료로 이용되는 식품이라고 알려져 있다(Bhadauria과 Nirala, 2009). 구성 성분으로는 플라보노이드, 카로테노이드, 테펜, 식물스테롤 등과 같은 페놀류, 비타민(A, C, D, E 및 K), 무기질과 같은 생리활성 성분이 풍부하다고 알려져 있다(Klaric, 2014; Klaric 등, 2018). 기존의 연구에서 꿀벌화분의 다양한 폴리페놀과 플라보노이드 성분들이 항산화 메커니즘을 통한 항동맥 경화증(Nader 등, 2010), 간 대사효소의 활성과 지방질량 조절을 통한 간보호 효과(Bhadauria 등, 2008), 염색체 이상이 유도된 비장 세포에서의 항돌연변이 효과(Abdella 등, 2009), tyrosinase 억제를 통한 미백활성효과가 있다고 보고되었다(Jin 등, 2018). 그 외에도 꿀벌 꽃가루 추출물의 항암, 항염증, 산화방지, 항곰팡이, 항

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

Tel: +82-41-330-1481

Fax: +82-41-330-1489

E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr

Received May 16, 2018; revised July 5, 2018;

accepted July 10, 2018

균 등의 다양한 치료적 특성이 보고된 바 있다(Gesek 등, 2010; Kim 등, 2015a; Nirala과 Bhadauria, 2008). 지금까지 이루어진 꿀벌 꽃가루 추출물에 대한 연구는 대부분 에탄올과 같은 유기용매 추출물에 집중되어져 있다.

본 연구에서는 꿀벌화분을 독성이 없는 물을 용매로 사용하여 획득된 추출물의 면역활성능에 관하여 알아보기 위하여 마우스 큰포식세포에 꿀벌 꽃가루 열수 추출물을 처리하여 세포생존율, 면역조절 물질인 NO, 염증유발 사이토카인(tumor necrosis factor- α ; TNF- α , interleukin-6; IL-6, IL-1 β)의 분비능, 세포표면 활성인자(cluster of differentiation; CD80/86, major histocompatibility complex; MHC class I/II)와 정확한 신호전달 체계를 알아보기 위해 MAPKs의 인산화와 NF- κ B의 발현 등에 미치는 영향에 관하여 관찰해 보았다.

재료 및 방법

꿀벌 꽃가루 열수 추출물(BPW)의 제조

본 실험에서 사용한 꿀벌화분은 생생드립(Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 꿀벌꽃가루 분말 40 g에 800 mL의 증류수(DW)를 가하여 100°C에서 2시간 열수 추출하였다. 추출물을 거름종이(No. 42, Whatman, Kent, UK)로 여과 후, 원심분리(3,200 rpm, 20 min)하여 상층액을 취하였고 동일한 방법으로 2회 반복하였다. 반복 추출하여 얻은 추출 상층액을 냉동 건조하여 -70°C에서 보관하여 본 실험에 사용하였다.

큰포식세포 배양

마우스의 유래의 큰포식세포주인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양을 위해 100 unit/mL 페니실린, 100 unit/mL 스트렙토마이신과 10% 소태아혈청(FBS)을 포함하는 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지(Life Technology, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% 이산화탄소 배양기(311, Thermo, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

세포 생존율 평가

RAW 264.7 큰포식세포를 96-well plate에 3×10^4 cell/well의 농도로 분주한 후 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고 BPW를 phosphate buffered saline (PBS, WelGene, Daegu, Korea)에 용해하여 62.5, 125 및 250 μ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 생존율 평가를 위하여 well당 30 μ L의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액(5 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 시약의 첨가로 생성된 포자간을 녹이기 위해서 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma-Aldrich)를 100 μ L씩 첨가하고 1시간 후 마이크로플레이트 판독기(Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

NO 유도능 평가

분리된 배양 상층액 100 μ L에 동량의 Griess (Sigma-Aldrich)시약을 처리하여 10분 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 판독기(BioTek)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 아질산소듐(NaNO_2 , Sigma-Aldrich)을 사용하여 얻은 표준 직

선과 비교하여 산출하였다.

사이토카인 분비 유도능 평가

48-well plate에 RAW 264.7 큰포식세포를 5×10^4 cell/well로 분주한 후 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, PBS에 용해된 BPW (62.5, 125 및 250 μ g/mL)농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하고 배양 상층액을 분리하였다. 분리된 배양 상층액에서 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 함량을 측정하였다. 사이토카인 함량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 사이토카인의 농도는 kit에 포함되어 있는 표준 용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

세포 표면 활성 인자(cell surface marker) 평가

BPW의 처리가 큰포식세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 RAW 264.7 큰포식세포를 각 6-well plate에 well당 1×10^6 개로 분주한 후, BPW를 각 125 μ g/mL 및 250 μ g/mL의 농도로 처리한 후 24시간 동안 반응시키고 각각의 세포를 회수하였다. 항체의 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 회수된 각각의 세포에 1 μ g/mL의 Fc γ I/III (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)을 처리하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후, 큰포식세포 표면 활성 인자 분석을 위하여 anti-CD80-PE, anti-CD86-PE, anti-MHC I과 II-PE (BD Biosciences)와 같은 세포 표면 항체를 각각 1,000배 희석하여 각각의 세포에 처리하고 30분 동안 반응시키고 유세포 분석기(FACS callibur, BD Biosciences)를 이용하여 BPW의 처리가 큰포식세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향에 관하여 분석하였다.

웨스턴 블롯 분석

RAW 264.7 큰포식세포를 6 well plate에 2×10^6 cell/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고 BPW를 125 및 250 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 후 NP40 세포분해완충용액(Biosource, Gangnam-gu, Seoul, Korea)를 첨가한 후 13,000 \times g에서 15분간 원심분리해서 세포 분해물을 분리하였다. 핵 내의 단백질을 분리하기 위하여, 상기 수집된 세포에 저장성 완충액(10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM magnesium chloride (MgCl₂), 10 mM 염화포타슘 (KCl), 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1 μ M leupeptin와 0.2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF))을 20분간 처리한 후 12,000 \times g에서 1분간 원심분리하여 세포질과 핵을 분리하였으며, 분리된 핵을, 고장성 용액(20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.5 mM DTT, 1 μ M leupeptin, 0.2 mM PMSF)을 처리하여 10,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 핵단백질을 추출하였다. 분리된 세포 분해물은 BCA 단백질 검출 키트(Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질 정량을 실시하였고, well당 20 μ g/mL의 세포 분해물을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 각각 loading하여 SDS-PAGE로 변성분리 하였다. 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 transfer하였고, membrane은 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution (5% skim milk) 20 mL에서 1시간 방치하였다. 이 후 TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며, iNOS, COX-2, p-p38, p-ERK, p-JNK 및 NF- κ B의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체(Cell signaling, Danvers, MN, USA)를 1:2,000으로 희석하여 4시간 동안

반응시키고, TBST로 5분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항체(goat anti rabbit IgG, Calbio-chem, La Jolla, CA, USA)를 1:5,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, 현상을 위하여 electrochemiluminescence (ECL, Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 시약을 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, 시료 간의 유의성은 던칸시험으로 $p < 0.05$, 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

BPW의 세포 생존율 평가

BPW의 처리가 큰포식세포의 세포독성에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 RAW 264.7 세포에 농도별 BPW를 처리하여 BPW에 대한 큰포식세포의 생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1A). LPS (200 ng/mL)와 BPW를 62.5, 125와 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, LPS 처리군 및 BPW 처리군 모두에서 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 BPW의 처리는 큰포식세포의 세포독성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되어 추후 BPW의 처리가 NO와 사이토카인의 생성능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 BPW의 농도를 250 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 고정하여 실험하였다.

BPW의 iNOS 관련 NO 생성에 미치는 영향

큰포식세포는 외부 항원의 침입에 의해 활성화되면 항원을 포식하며, NO와 같은 활성 질소종과 사이토카인을 대량으로 생산하여 후천성면역세포인 T 세포에 항원에 대한 정보를 제시해 후천성면역반응의 활성을 유도한다(Lee 등, 2006). 활성화된 큰포식세포가 분비하는 NO는 산화질소 합성 효소(inducible NO synthase; iNOS)에 의해 L-아르기닌으로부터 생성되는 무기 유리체이며, 주로 면역반응, 세포독성과 신경전달에 관여하여 세포 기능 유지에 중요한 역할을 수행한다. 따라서 NO 분비능의 증가는 큰포식세포의 활성화에 관한 바이오마커로 주로 사용된다(Flurkey, 1991; Gao 등, 2000; Jung과 Park, 2005). BPW의 처리에 따른 큰포식세포 활성화에 미치는 영향을 측정하기 위하여 RAW 264.7 큰포식세포에 양성 대조군인 LPS (200 ng/mL)와 BPW를 각각 농도별 (62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하고, 세포 상층액에서 NO의 분비능에 관하여 관찰하였다(Fig. 1B). 양성대조군인 LPS 단독 처리군에서 NO의 분비능이 $12.35 \pm 0.38 \mu\text{M}$ 로 크게 증가된 것으로 관찰되었다. 또한 BPW를 세포독성에 영향을 미치지 않는 농도인 62.5, 125와 250 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 결과, 각각 3.26 ± 0.22 , 5.22 ± 0.44 , $7.25 \pm 0.17 \mu\text{M}$ 로 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 활성화된 큰포식세포가 분비하는 NO는 강한 이원자 자유라디칼로 미생물과 같은 병원성 항원에 의해 감염된 세포나 암세포의 증식을 제어하는 등의 다양한 체내방어기능을 가지고 있는 인체 내 중요한 물질이다. NO의 생성 증가 원인에 관해 알아보기 위하여, NO 생성에 관여하는 단백질인 iNOS의 세포내 발현에 관하여 관찰하였다(Fig. 1C). BPW를 125와 250 μg

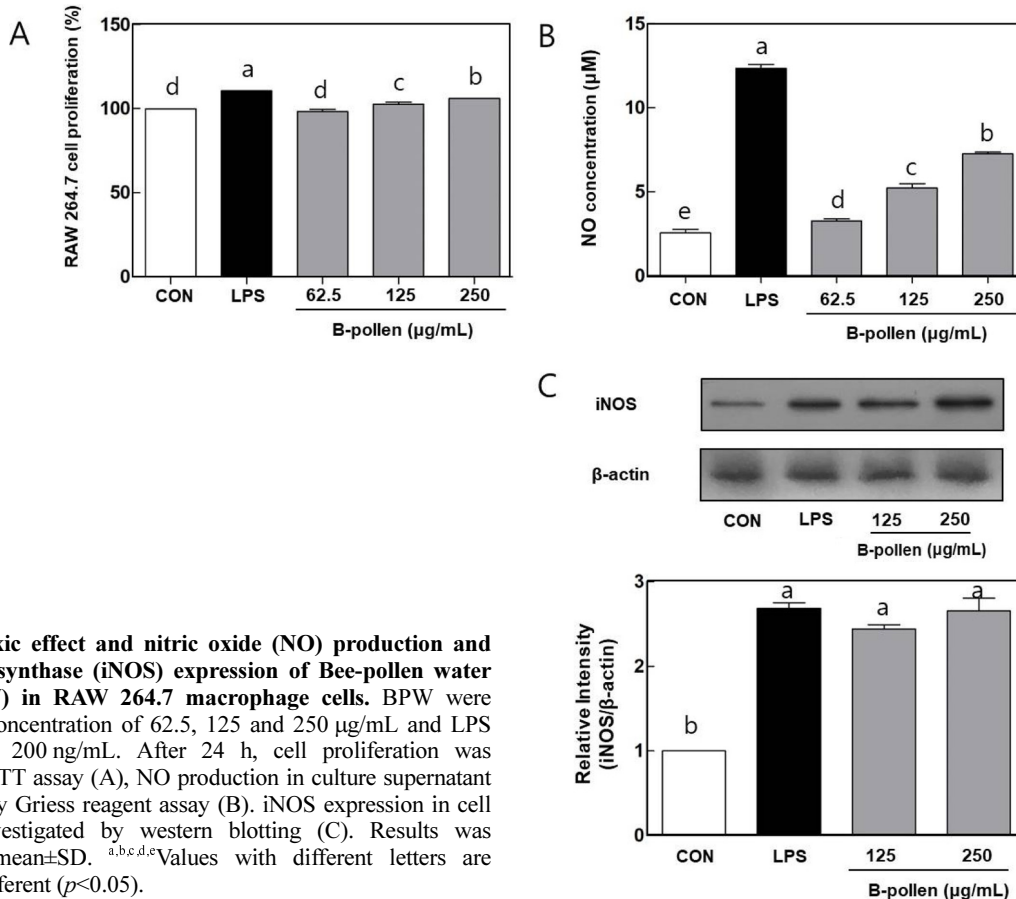


Fig. 1. Cytotoxic effect and nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) expression of Bee-pollen water extracts (BPW) in RAW 264.7 macrophage cells. BPW were treated at the concentration of 62.5, 125 and 250 $\mu\text{g/mL}$ and LPS was treated at 200 ng/mL. After 24 h, cell proliferation was measured by MTT assay (A), NO production in culture supernatant was analyzed by Griess reagent assay (B). iNOS expression in cell lysate was investigated by western blotting (C). Results was expressed as mean \pm SD. ^{a,b,c,d,e}Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

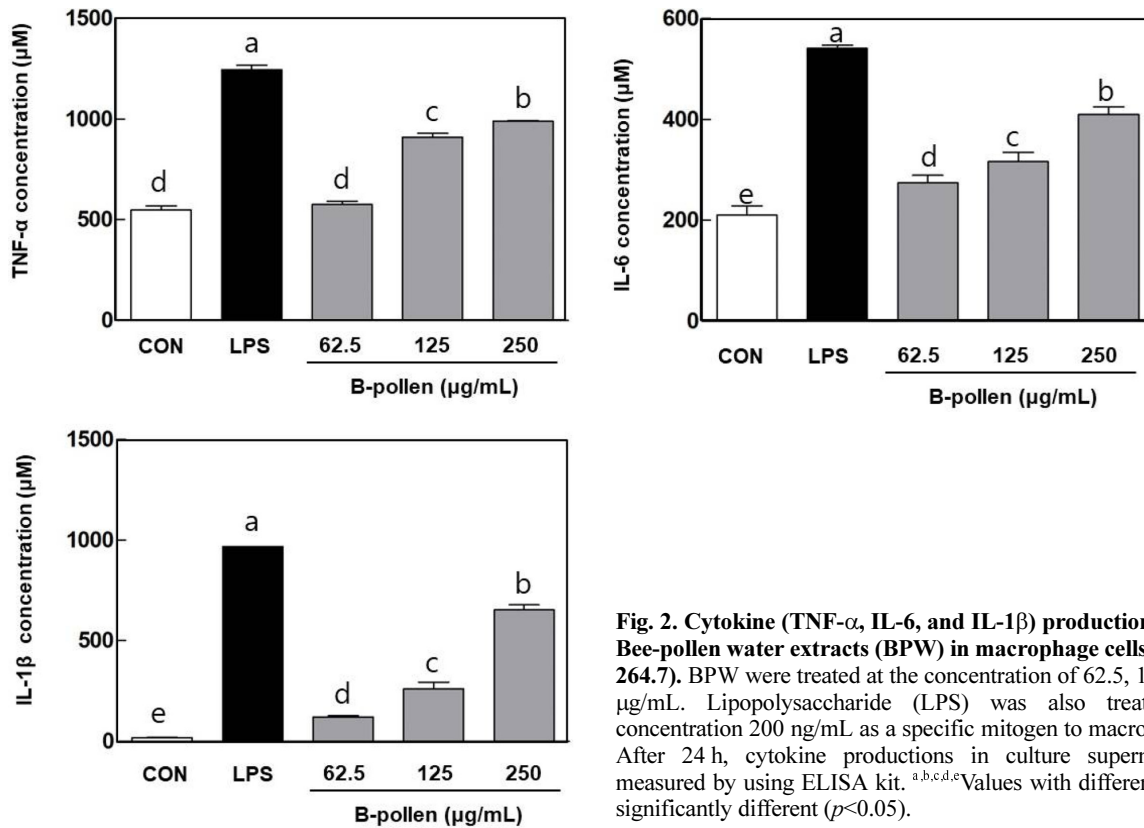


Fig. 2. Cytokine (TNF- α , IL-6, and IL-1 β) production activity of Bee-pollen water extracts (BPW) in macrophage cells line (RAW 264.7). BPW were treated at the concentration of 62.5, 125, and 250 $\mu\text{g/mL}$. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 200 ng/mL as a specific mitogen to macrophage cells. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. ^{a,b,c,d,e}Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

mL의 농도로 처리하여 큰포식세포 내 iNOS 발현을 관찰한 결과, NO 분비능의 경향과 유사하게 BPW 처리구 세포내 iNOS의 발현이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 BPW 처리에 따른 NO 분비능의 증가는 세포내 iNOS 발현이 증가에 따른 것으로 사료되어, BPW는 큰포식세포의 활성화를 일으켜 NO 분비능을 증가시켜 큰포식세포의 면역활성에 기여하는 것으로 관찰된다.

BPW의 사이토카인 분비능에 미치는 영향

외부로부터 생체로 유입된 병원균인 바이러스와 세균과 같은 항원에 의해 활성화된 큰포식세포는 직접적으로 탐식하거나, 사이토카인과 같은 면역 매개물질을 분비함으로써 면역반응을 유도한다(Byun과 Byun, 2015). 사이토카인은 면역세포 간 상호작용을 매개하여 신호전달을 위한 중요한 면역조절인자이며, 큰포식세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등이 있다. TNF- α 는 큰포식세포가 분비하는 사이토카인으로써, 외부로부터 유입되는 병원균과 같은 항원에 오염된 세포의 살해능력을 활성화시켜 숙주의 감염부위를 국소화시켜 초기 면역반응에서 중요한 역할을 수행한다(Kim 등, 2015b). IL-6는 B 세포와 T 세포의 기능을 조절해 체액성반응을 조절하고, 조혈 작용을 활발하게 일어나게 하며, IL-1 β 는 TNF- α 와 유사하게 외부로 유입된 병원성 항원의 확산을 감소시킴으로써 초기 감염반응의 확대를 감소시키며, B 세포와 T 세포의 활성을 촉진시켜 후천성 면역반응의 개시반응을 빠르게 진행시키는 역할을 수행한다(Lee 등, 2011; Byun, 2015). 따라서 큰포식세포에서 면역반응의 매개자 역할을 수행하는 사이토카인 분비능의 증가는 초기면역반응에 따른 과도한 염증 발생을 억제하고, B 세포, T 세포의 분화를 촉진시키거나, 외부 병원성 항원의 침입에 따른 염증을 억제하는데 중요한 역할을 수행한다. BPW의 처리가 큰포식세포의 사이토카인인 분비능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 큰포

식세포에 BPW를 처리하여 배양 상층액에 존재하는 사이토카인의 함량을 ELISA법으로 측정하였다(Fig. 2). 양성대조구인 lipopolysaccharide (LPS) (200 ng/mL) 처리 시, 큰포식세포의 사이토카인(TNF- α ; 1244 ± 33.74 pg/mL , IL-6; 540.61 ± 11.02 pg/mL , IL-1 β ; 1056.41 ± 53.2 pg/mL)이 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. BPW 처리구에서 TNF- α 의 분비량은, 575.64 ± 22.46 , 910.76 ± 25.47 과 988.80 ± 6.52 pg/mL 로 나타났으며, IL-6의 분비량은, 274.22 ± 21.42 , 316.19 ± 331.99 와 409.69 ± 26.04 pg/mL 로 나타났으며, IL-1 β 의 분비량은, 134.21 ± 1.2 , 167.40 ± 2.1 과 237.23 ± 1.8 pg/mL 로 BPW 처리농도 의존적으로 사이토카인의 분비량이 증가되는 것으로 관찰되었다. 일반적으로 활성화가 일어나지 않은 큰포식세포는 미생물과 바이러스와 같은 외부 항원에 감작된 세포를 제거하는데 효과적이지 않다. 그러나 활성화가 일어난 큰포식세포는 외부 항원에 감작된 세포를 제거하는 능력이 크게 증가한다. BPW의 처리는 큰포식세포의 NO 분비능을 증가시키는 것뿐만 아니라, 면역활성에 관여하는 다양한 사이토카인의 분비능을 조절하여 큰포식세포의 면역활성에 기여하는 것으로 판단된다.

BPW의 큰포식세포의 세포 표면 활성 인자에 미치는 영향

다양한 면역세포들은 세포 표면에 부착되어있는 세포표면 분자구조에 따라 서로를 구분하며, 이러한 구분은 분화집단(cluster of differentiation; CD)이라는 표현형을 사용한다(Lee 등, 2001). CD는 활성화된 T 세포의 분열을 촉진시키는 항원제시 세포로서의 역할시 필수적으로 요구되는 세포막 단백질로 세포의 활성화와 관련하여 중요한 지표로 이용된다(Cho 등, 2007). 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex; MHC)는 선천성면역세포들이 후천성 면역세포인 T 세포에 바이러스와 세균과 같은 병원체의 항원에 대한 정보를 제시할 때 사용하는 막 단백질로 면역반응을 전개한다(Piani 등, 2000). 탐식세포가 포함하고 있는

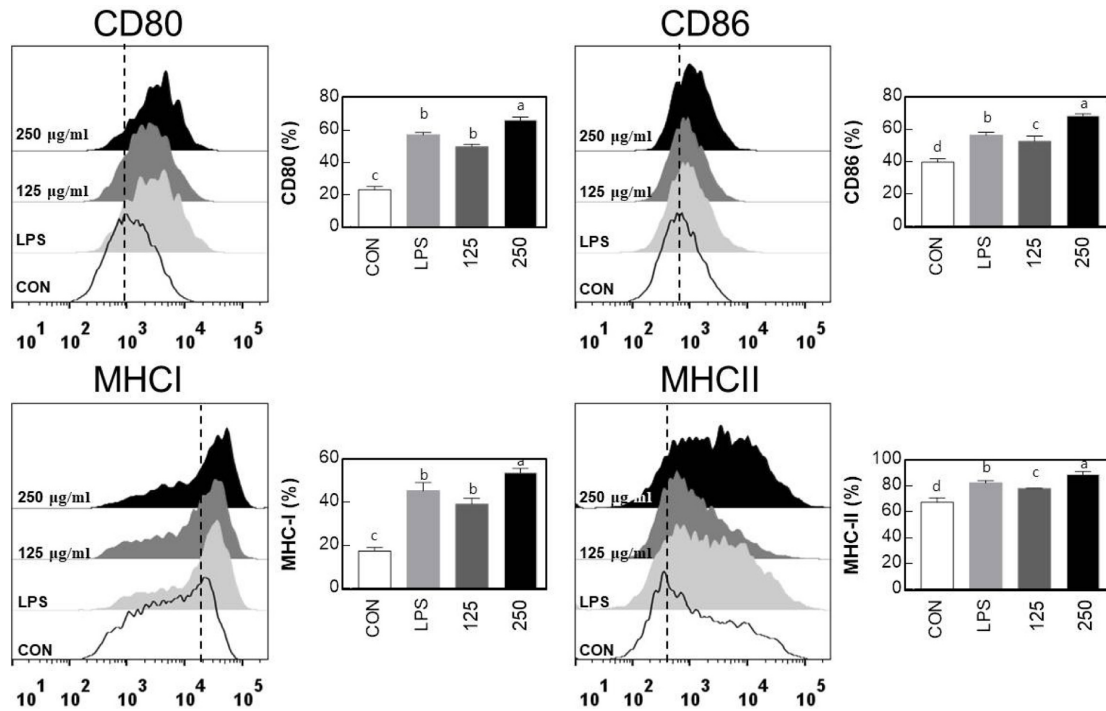


Fig. 3. Expression of costimulatory (CD80, 86) and MHC class (I,II) molecules by Bee-pollen water extracts (BPW) in macrophage cell line (RAW 264.7). BPW was treated at the concentration of 125 and 250 g/mL. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 200 ng/mL in macrophage cells (RAW 264.7). All experiments were conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. ^{a,b,c,d} Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

구조적합성 복합체로는 MHC class I과 II가 존재하며 큰포식 세포와 같은 탐식세포가 활성화되지 않았을 때는 적은 양의 발현이지만, 면역세포들이 활성화가 되면 많은 양이 발현되어 T 세포에 많은 양의 항원을 전달할 수 있으며, T 세포를 활성화시켜 후천성면역반응을 증폭시킨다(Hegde 등, 2003). MHC class I은 모든 세포에 발현이 되어 있는 세포표면단백질로 T 세포에 항원을 제시하여 항원을 제시한 세포가 세포독성 T 세포에 의해 제거되며, MHC class II는 특정 면역세포에만 존재하여, 탐식세포가 B 세포나 보조 T 세포에 항원을 제시하면 그 항원에 대한 면역 작용을 활성화시킨다. 따라서 CD80, 86, MHC class I과 II의 발현의 증가는 큰포식세포와 같은 탐식세포의 활성화에 매우 밀접한 관련이 있다(Mo 등, 2017). BPW의 처리가 큰포식세포의 세포표면활성 인자의 발현량에 미치는 영향을 유세포 분석기를 통하여 관찰하였다(Fig. 3). BPW를 농도별(125와 250 µg/mL)로 처리하여 CD80과 86 그리고 MHC class I과 II의 발현에 관하여 관찰한 결과 모든 BPW 처리구에서 발현이 증가되는 것으로 관찰되었으며, 처리농도가 증가할수록 발현량이 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 BPW의 처리는 큰포식세포의 세포표면활성 인자들의 발현을 직접적으로 증가시켜 면역세포를 활성화시키는 것으로 사료된다.

BPW의 MAPKs와 NF-κB의 인산화에 미치는 영향

Mitogen-activated protein kinase (MAPKs)와 NF-κB는 면역세포에서 면역활성을 매개하는 대표적인 신호전달 체계로서, 여러 외부 자극에 의해 면역반응이 매개되면 면역세포 내부의 신호전달 체계가 활성화 되면서, 면역매개물질인 NO와 사이토카인 등의 분비가 촉진된다(Brewer 등, 1992). 대표적인 MAPKs의 단백질에는 세포 밖 조절 단백질 인산화효소(extracellular regulated

protein kinase; ERK), c-Jun NH₂-단백질 인산화효소(JNK)와 세린/트레오닌 단백질 인산화효소(serine/ threonine protein kinase; p38) 등이 있으며, 각 단백질의 인산화의 유무에 따라 활성을 판단한다(Cobb과 Goldsmith, 2000).

일반적으로 NF-κB는 NF-κB 억제제(Iκ-B) 단백질과 결합하여 불활성화 상태로 세포질에 존재하다가 활성화된 MAPKs로부터 인산화된 Iκ-B와 결합하여, 핵 내로 이동한다(Kwon 등, 2016). NF-κB가 핵 내로 이동하여 활성화 되면 활성화제 단백질-1(activator protein-1, AP-1) 등과 같은 핵 내의 다른 면역 활성인자를 인산화시켜, 면역매개물질들의 유전자 발현을 유도하게 된다. 따라서 면역반응의 신호전달 체계에서 MAPKs와 NF-κB의 활성화는 면역반응의 개시, 유지, 발전에 매우 중요한 역할을 수행한다(Kim 등, 2013).

본 연구에서 BPW의 처리가 매개하는 면역반응의 메커니즘에 관하여 분석하기 위하여, BPW 처리된 세포 내 MAPKs (ERK1/2, p38와 JNK)와 NF-κB의 활성화에 관하여 관찰하였다(Fig. 4). 양성처리구인 LPS 처리구(200 ng/mL)에서 ERK1/2, p38과 JNK의 인산화가 증가되었으며, 핵 내 NF-κB의 발현 또한 증가하였다. BPW를 125와 250 µg/mL 농도로 처리한 후, 면역 세포내 MAPKs의 인산화와 핵 내 NF-κB의 발현에 관하여 관찰한 결과, BPW 처리구에서 ERK1/2, p38과 JNK의 인산화가 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한 핵내 NF-κB의 발현이 MAPKs의 결과와 유사하게 증가되는 것으로 관찰되었다.

따라서 본 비교 연구에서 BPW의 처리가 면역활성을 유도하는 것으로 나타났으며, BPW의 처리는 MPAKs의 인산화와 NF-κB의 핵 내 이동성을 증가시켜 높은 면역활성을 유지하는 것으로 사료된다.

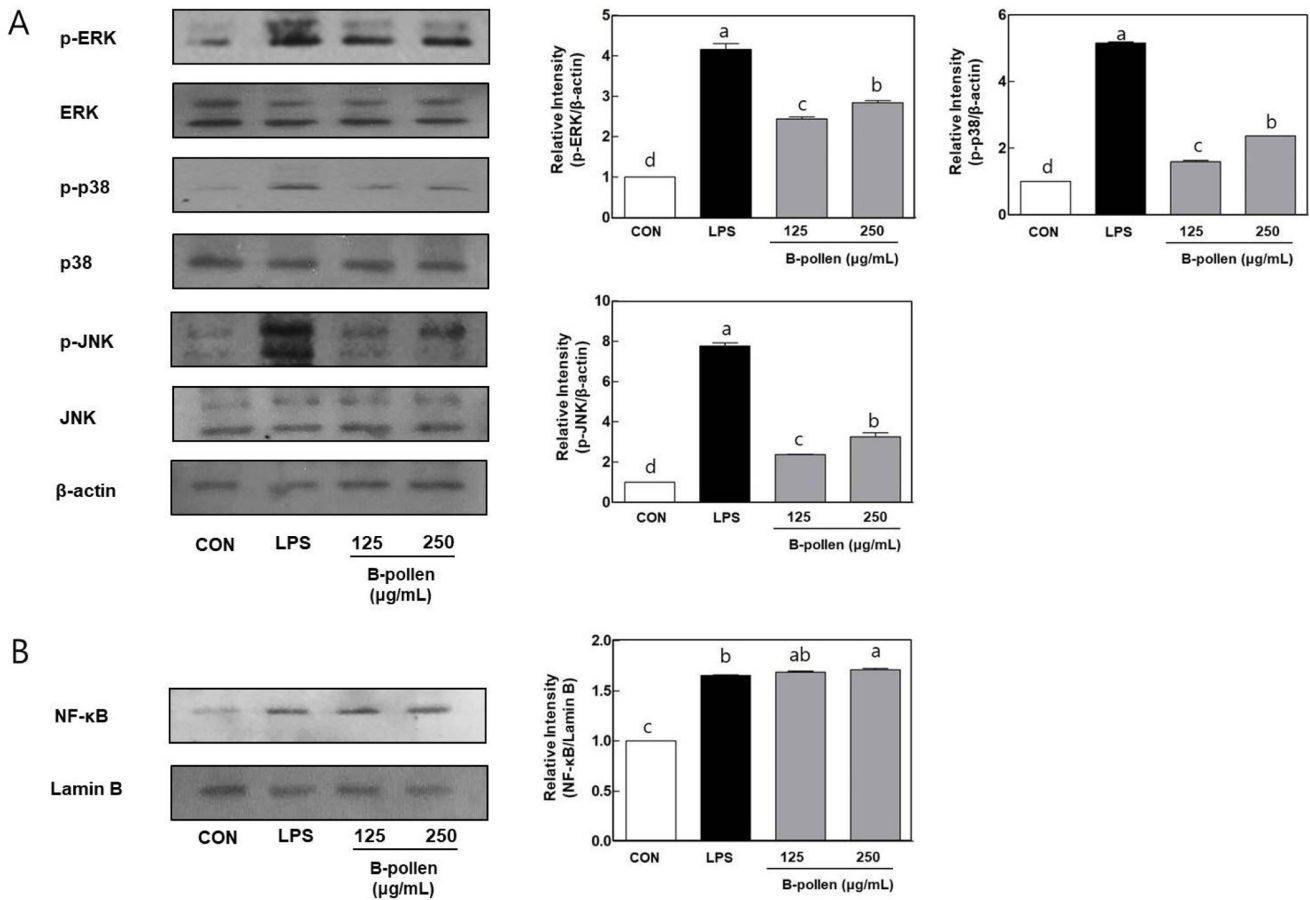


Fig. 4. Effect of Bee-pollen water extracts (BPW) on MAPKs phosphorylation and NF- κ B expression in RAW 264.7 macrophage cells. BPW were treated at the concentration of 125 and 250 μ g/mL for 30 min. LPS (200 ng/mL) was used as a positive control. MAPKs phosphorylation and NF- κ B expression were evaluated by western bolt analysis using specific antibodies to ERK1/2, phospho-ERK1/2, p38, phospho-p38, JNK, phospho-JNK (A) and phospho-NF- κ B (B). Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). ^{a,b,c,d} Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

요약

본 연구는 꿀벌 꽃가루 열수 추출물(BPW)의 면역 활성화에 관하여 알아보기 위하여, 선천면역과 적응면역에서 중심 역할을 수행하는 큰포식세포에 BPW를 처리하여 세포 생존율, NO 분비능, 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β) 분비능과 매커니즘 분석을 통한 신호전달에 관하여 관찰하였다. BPW를 큰포식세포에 처리하여 면역활성에 관하여 알아봤을 때, 큰포식세포 면역활성의 대표적인 바이오마커인 NO, 사이토카인의 분비능과 iNOS의 세포내 발현이 BPW 처리구에서 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. 또한 활성화된 탐식 세포의 세포 표면에서 발현되는 CD80과 CD86의 발현과 탐식세포의 항원제시에 밀접한 관련이 있는 주조직적합성 복합체(MHC class I과 II)의 발현이 BPW 처리구에서 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. 기전분석 결과, BPW의 처리는 MAPKs의 인산화와 NF- κ B의 핵 내 이동성을 증가시켜 면역활성을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 따라서 BPW의 처리는 큰포식세포의 활성을 유도시켜 면역활성을 조절하는 것으로 관찰되었다.

References

Abdella EM, Tohamy A, Ahmad RR. Antimutagenic activity of

- egyptian propolis and bee pollen water extracts against cisplatin-induced chromosomal abnormalities in bone marrow cells of mice. *Iran. J. Cancer Prev.* 4: 175-181 (2009)
- Bhadauria M, Nirala SK, Shukla S. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem. Toxicol.* 46: 2703-2712 (2008)
- Bhadauria M, Nirala SK. Reversal of acetaminophen induced sub-chronic hepatorenal injury by propolis extract in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27: 17-25 (2009)
- 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)
- Byrd JC, Park JH, Schaffer BS, Garmroudi F, MacDonald RG. Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 25: 18647-18656 (2000)
- 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)
- Byun EH. Immunomodulatory activities of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Food Sci. Ind.* 49: 559-566 (2017)
- Byun MW, Byun EH. Immunological synergistic effects of combined treatment with herbal preparation (hemohim) and red ginseng extracts. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 182-190 (2015)
- Cha JH, Lim EM. Effects of Gardeniae fructus on cytokines in mouse macrophage. *J. Korean Obstet Gynecol.* 27: 1-16 (2014)
- Cho JY, Kim BH, Cho DH. Modulatory effect of kaempferitrin, a 3,7-filycosylflavone, on the LPS-mediated up-regulation of surface co-stimulatory molecules and CD29-mediated cell-cell adhe-

- sion in monocytic-and macrophage-like cells. *Yakhak Hoeji*. 51: 482-489 (2007)
- Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci*. 25: 7-9 (2000)
- Flurkey WH. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J. Food Sci*. 56: 93-95 (1991)
- 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)
- Gesek M, Szarek J, Szweda M, Babinska I. Comparative pathomorphological pattern of the liver in broiler chickens of two breeding lines. *J. Comp. Pathol*. 143: 343-346 (2010)
- Hegde NR, Chevalier MS, Johnson DC. Viral inhibition of MHC class II antigen presentation. *Trends Immunol*. 24: 278-285 (2003)
- Huang H, Shen Z, Geng Q, Wu Z, Shi P, Miao X. Protective effect of *Schisandra chinensis* bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. *Biomed Pharmacother*. 95: 1765-1776 (2017)
- Jin TY, Saravanakumar K, Wang MH. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 13: 186-189 (2018)
- 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)
- 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 (2015a)
- Kim SB, Jo YH, Liu Q, Ahn JH, Hong IP, Han SM, Hwang BY, Lee MK. Optimization of extraction condition of bee pollen using response surface methodology: correlation between anti-melanogenesis, antioxidant activity, and phenolic content. *Molecules* 20: 19764-19774 (2015b)
- 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- κ B and MAPK inhibition. *J. Korean Med. Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 26: 54-64 (2013)
- Klaric I, Domacinovicl M, Seric V, Miskulin I, Pavic M, Paradinovic K. Effects of Beepollen and propolis on performance, mortality, and some haematological blood parameters in broiler chickens. *Slov. Vet. Res*. 55: 23-24 (2018)
- Klaric I. Production and health effects of propolis and bee pollen as food additives in broilers feeding. *Agriculture* 20: 61-64 (2014)
- Klump AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 44: 143-161 (2002)
- 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)
- 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)
- 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)
- Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, Kim K, Han SS, Lee CK. Acemannan purified from Aloe vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int. Immunopharmacol* 1: 1275-1284 (2001)
- Lee JY, Hwang WI, Lim ST. Effect of Platycodon grandiflorum DC extract on the growth of cancer cell lines. *Korean J. Food Sci. Technol*. 30: 13-21 (1998)
- Mo ZQ, Wang JL, Yang M, Ni LY, Wang HQ, Lao GF, Li YW, Li AX, Luo XC, Dan XM. Characterization and expression analysis of grouper (*Epinephelus coioides*) co-stimulatory molecules CD83 and CD80/86 post *Cryptocaryon irritans* infection. *Fish Shellfish Immunol*. 67: 467-474 (2017)
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol*. 11: 723-737 (2011)
- Nader MA, El-Agamy DS, Suddek GM. Protective effects of propolis and thymoquinone on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arch. Pharm. Res*. 33: 637-643 (2010)
- Nirala SK, Bhadauria M. Propolis reverses acetaminophen induced acute hepatorenal alterations: A biochemical and histopathological approach. *Arch Pharm Res*. 31: 451-461 (2008)
- Piani A, Hossle JP, Birchler T, Siegrist CA, Heumann D, Davies G, Loeliger S, Seger R, Lauener RP. Expression of MHC class II molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. *Eur. J. Immunol*. 30: 3140-3146 (2000)
- Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol* 6: 317-333 (2006)
- Sung NY, Park WY, Kim YE, Cho EJ, Song HY, Jun HK, Park JN, Kim MH, Ryu GH, Byun EH. Increase in antioxidant components and reduction of off-flavors on radish leaf extracts by extrusion process. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 45: 1769-1775 (2016)