

## 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*) 열매에서 분리된 조다당의 큰포식세포 면역 활성 조절

조은지<sup>1</sup> · 김이은<sup>1</sup> · 변의홍<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>공주대학교 식품공학과, <sup>2</sup>공주대학교 식품과학연구소

### Immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from *Cudrania tricuspidata* fruits in macrophage

Eun-Ji Cho<sup>1</sup>, Yi-Eun Kim<sup>1</sup>, and Eui-Hong Byun<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Kongju National University

<sup>2</sup>Food Science Research Institute, Kongju National University

**Abstract** Macrophages play a crucial role in the host immune defense system. The current study investigated immunomodulatory activities induced by polysaccharides extracted from *Cudrania tricuspidata* (CTPS) fruits in murine macrophages and their role in signaling pathways. In macrophages, CTPS predominantly induced nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-6 production. In addition, CTPS significantly up-regulated expression of the macrophage surface marker (CD80/86 and MHC class I/II). These results indicate that polysaccharides extracted from CTPS may potentially play an immunomodulatory role in macrophages via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- $\kappa$ B signaling. These findings may be useful in the development of immune enhancing adjuvant materials obtained from natural sources.

**Keywords:** *Cudrania tricuspidata* fruits polysaccharide, immunomodulatory activity, macrophage, nitric oxide, cytokine

## 서 론

식물체로부터 유래된 다당류(polysaccharides)는 면역 증강 인자로 잘 알려져 있으며, 넓은 범위의 생물, 의학적 분야에서 낮은 독성으로 인해 주목받고 있다. 식물의 다당류는 보체 및 큰포식세포 등의 활성을 통해 세포분화, 정보전달, 면역증진 및 항암효과를 높게 증가시키는 것으로 보고되어지며, 또한 선천면역계의 조절을 통해 인체 내로 침투한 병원균을 강력하게 제거하는데 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Schepetkin과 Quinn, 2006). 최근 식품 성분들은 기존의 영양적 역할 뿐만 아니라 다양한 생리조절 작용을 밝혀려는 노력이 여러 각도에서 이루어지고 있다. 이 중 생명 유지와 건강에 가장 기본적인 작용을 하며 암을 비롯한 각종 질환의 발생과 밀접한 관련이 있는 생체 면역 조절의 기능에 특히 관심을 모으고 있다(Kim 등, 2005).

면역기능은 외부의 병원 인자들로부터 인체의 주요 방어 메커니즘으로 감염 작용에 대하여 다양한 면역세포들은 작용하여 병원성 미생물의 생체 내 침입을 통제하는 시스템으로 이러한 면역기능이 떨어질 경우 인체는 다양한 질병에 노출될 수 있다. 면역 반응은 항원에 대한 특이성에 따라 선천성 면역반응과 후천

성 면역반응으로 분류되는데 면역 단계에 따라 역할을 수행하는 면역세포들이 다르다. 선천성 면역반응에 관여하는 세포는 큰포식세포와 수지상세포 등이 있으며, 감염 초기에 활성화되어 병원균에 대한 정보를 내부에 전달하는 역할을 하며 항원특이적인 반응을 수반하지 않는다. 후천성 면역반응에 관여하는 세포는 T 세포와 B 세포에 의하여 이루어지고 선천성 면역반응 후 포식세포에 의하여 제시되는 특이 항원을 인식하면서 감염된 세포를 직접 죽이거나 병원성 물질에 대한 항체 생산을 촉진하여 무력화시키는 작용을 유도한다(Byun과 Byun, 2015; Byun 등, 2016).

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로 한국을 비롯한 일본, 중국과 러시아 동부지역 등에서 주로 분포하며 우리나라에서는 1종만이 전국 각지에서 자생하고 있다. 서아시아지역에서는 전통약초로서 사용되어 온 약재 중 하나로서 줄기가 주로 사용되며, 잎과 열매는 식용작물로 이용되어 왔다(Choi 등, 2012; Hano 등, 1990). 예로부터 잎, 뿌리는 습진, 폐결핵, 만성 요통, 타박상, 급성관절염 등의 한방치료에 사용되었으며, 줄기는 잔틴(xanthones), 플라보노이드 등의 폴리페놀 성분이 다량 함유되어 있으며, 타이로시네이스 억제, 산화방지, 세포독성, 항염증 활성화에 대한 효과가 알려져 있다(Cha 등, 2000; Chen 등, 1995; Jang, 2003; Kang 등, 2002; Ottersen 등, 1997). 하지만 이들 연구는 주로 줄기에 대하여 많은 연구가 진행된 반면, 열매에 대한 연구는 항균활성, 산화방지 및 항염증 활성화에 대한 연구가 보고되어 있을 뿐이다(Seo 등, 2013; Youn과 Kim, 2012). 꾸지뽕나무 열매에서 분리된 다당류의 면역 활성 효과에 관한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다.

본 연구는 꾸지뽕 열매로부터 다당류 성분을 추출하고 추출된 다당류의 면역 활성에 관하여 알아보기 위하여 마우스 기원의 큰

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

Tel: +82-41-330-1481

Fax: +82-41-330-1489

E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr

Received July 4, 2018; revised August 21, 2018;

accepted August 21, 2018

포식세포주인 RAW 264.7에 꾸지뽕 열매에서 분리한 다당류를 처리하여 면역 조절 물질인 산화질소(II), 전염증성 사이토카인의 분비능과 세포 표면 분자 활성, mitogen-activated protein kinase (MAPK) 인산화 및 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B의 발현 등에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 꾸지뽕 열매 조다당류(CTPS) 추출

본 연구에서 사용된 꾸지뽕 열매는 충청남도 예산군(Yesan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 건조된 꾸지뽕 열매를 실험실 용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여, 꾸지뽕 열매 분말 50 g에 400 mL의 증류수(DW)를 가하여 100°C에서 2 시간 동안 열수추출하였다. 추출물을 거름종이(No. 4, Whatman, Kent, UK)로 여과 후 여과액에 70% 에탄올을 가하여 4°C에서 12 시간 동안 방치한 후 원심분리(3,200 rpm, 20 min)하여 침지된 조다당류(CTPS)를 분리하여(Khawla 등, 2016), 이를 냉동 건조하여 실험에 사용하였고, 이때 얻어진 조다당류의 수율은 4.49% (w/w) 였다.

### 세포배양

마우스의 큰포식세포주인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Korea cell line bank, Seoul, Republic of Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양을 위해 100 unit/mL 페니실린 및 100 unit/mL 스트렙토마이신과 10% 소태아혈청을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technology, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% 이산화탄소 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% 이산화탄소 배양기에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고 CTPS를 phosphate buffered saline (PBS, WelGene, Dalseogu, Daegu, Korea)에 용해하여 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000  $\mu$ g/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였다. Well당 30  $\mu$ L의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액(5 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT시약의 첨가로 생긴 formazan을 녹이기 위해서 다이메틸 설펝사이드(DMSO, Sigma-Aldrich)를 100  $\mu$ L씩 첨가하고 1시간 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{Sample 처리구의 흡광도}}{\text{Sample 무처리구의 흡광도}} \times 100$$

### 사이토카인 분비 유도능 평가

48-well plate에 RAW 264.7 cell을  $5 \times 10^4$  cell/well로 분주한 후 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, PBS에 용해된 CTPS (31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000  $\mu$ g/mL) 또는 양성대조구인 지방질다당류(lipopolysacchride, LPS, 200 ng/mL)농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하여 배양 상등액을 분리하였다. 분리된 배양 상등액에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 산화질소(II)의 함량을 측정하였다. 사이토카인 함

량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 사이토카인의 농도는 키트에 포함되어 있는 표준 용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

### 산화질소(II) (Nitric oxide) 유도능 평가

분리된 배양 상등액 100  $\mu$ L에 동량의 Griess (Sigma-Aldrich) 시약을 처리하여 10분 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화질소(II)의 농도는 아질산소듐( $\text{NaNO}_2$ , Sigma-Aldrich)을 사용하여 얻은 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

### 세포 표면 활성 인자(cell surface marker) 평가

CTPS의 처리가 큰포식세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 RAW 264.7 큰포식세포를 각 6 well plate에 well 당  $1 \times 10^6$  cell/well의 농도로 분주한 후, CTPS를 각 500 및 1,000  $\mu$ g/mL의 농도로 처리한 후 24시간 동안 반응시키고 각각의 세포를 회수하였다. 항체의 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 회수된 각각의 세포에 1  $\mu$ g/mL의 Fcy I/III (BD Biosciences, Seoul, Korea)을 처리하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후, 큰포식세포 표면 활성 인자 분석을 위하여 anti-CD80-PE, anti-CD86-PE, anti-MHC I 및 II-PE (BD Biosciences)와 같은 세포 표면 항체를 각각 1,000배 희석하여 각각의 세포에 처리하고 30 분 동안 반응시키고 유세포 분석기(FACS callibur, BD Biosciences)를 이용하여 CTPS의 처리가 큰포식세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향에 관하여 분석하였다.

### Western blot analysis

RAW 264.7 큰포식세포를 6-well plate에  $2 \times 10^6$  cell/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고 CTPS를 500 및 1,000  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 후 NP40 cell lysis buffer (Biosource, Gangnamgu, Seoul, Korea)를 첨가한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리해서 cell lysate를 분리하였다. 핵 내의 단백질을 분리하기 위하여, 상기 수집된 세포에 저장성 완충용액(10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ ), 10 mM potassium chloride (KCl), 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1  $\mu$ M leupeptin와 0.2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF))을 20분간 처리한 후 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 세포질과 핵을 분리하였으며, 분리된 핵을 고장성 완충액(20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) 0.5 mM DTT, 1  $\mu$ M leupeptin, 0.2 mM PMSF)을 처리하여 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 핵 단백질을 추출하였다. 분리된 cell lysate는 BCA protein detection kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질 정량을 실시하였고, well 당 20  $\mu$ g의 cell lysate를 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 각각 loading하여 SDS-PAGE로 변성분리하였다. 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 transfer하였고, 막은 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution (5% skim milk solution) 20 mL에서 1시간 방치하였다. 이후 TBST (20 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 5분씩 3회 세척하였으며, p-p38, p-ERK, p-JNK 및 NF- $\kappa$ B의 발현량을 측정하기 위해 1차항체(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 electro-chemiluminescence (ECL, Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Germany) reagent를 사용하여 인화하였다.

### 통계 분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, ver 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) 소프트웨어를 이용하여 일원분산분석으로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 던컨 시험으로  $p < 0.05$  수준에서 비교하였다.

## 결과 및 고찰

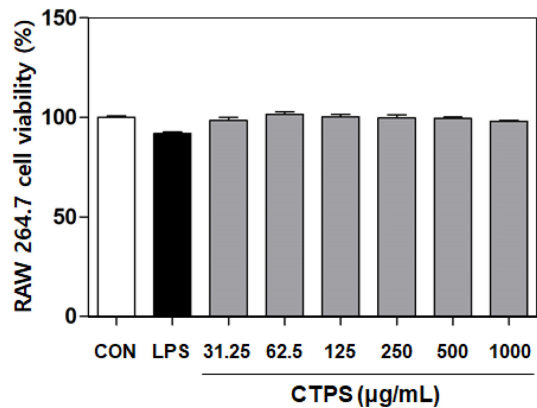
### CTPS의 세포 생존율 평가

CTPS가 큰포식세포의 세포독성 여부를 확인하기 위하여 큰포식세포 RAW 264.7 cell에 농도별 CTPS를 처리하여 세포의 생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). CTPS를 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않은 것을 관찰하였다. 따라서 CTPS는 큰포식세포에 세포독성에 영향을 미치지 않았으며, 추후 CTPS의 처리가 사이토카인 및 산화질소(II)의 생성능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 CTPS의 농도를 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 로 고정하여 실험하였다.

### CTPS의 산화질소(II) 및 사이토카인 분비능

큰포식세포는 숙주의 면역반응에 중추적인 역할을 수행하며, 병원성 항원이 생체 내에 침입하게 되면 큰포식세포가 이를 포식하여 항원에 대한 정보를 T 세포에 전달하여 세포매개면역반응이 일어난다. 일반적으로 활성화되지 않은 큰포식세포는 외래 항원에 대한 면역 기능 작용에 효과적이지 않다(Brewer 등, 1992). 반면에 활성화된 큰포식세포는 생체 내 미생물 및 바이러스에 감염된 세포를 제거하는데 매우 효과적이다(Lee 등, 1996). 이처럼 큰포식세포의 활성화 여부는 외부로부터 유입된 미생물의 침입에 있어서 초기 면역반응의 증강을 나타내는 지표로서 다양한 물질들의 면역활성능을 평가할 때 주로 이용된다(Bios, 1958). 큰포식세포 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해서 RAW 264.7 큰포식세포에 CTPS를 처리한 후 세포 상층액에서 산화질소(II)와 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생성에 대하여 알아보았다. 산화질소(II)는 면역계에서 외부 물질에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호 전달 물질로 산화질소(II)합성효소(nitric oxide synthase, NOS)의 작용에 의해 엘아르지닌으로부터 생성되는 무기 유도체로 면역반응, 세포독성, 신경 전달계 및 혈관 이완 등 여러 생물학적인 과정에 관여하여 혈관이완물질, 신경전달물질 및 면역계의 방어 물질로 알려져 있다(Yu 등, 2012). 하지만 LPS에 의한 과도한 산화질소(II)의 분비는 염증성 질환을 유도하여 세포 및 조직에 손상을 입히는 것으로 보고된 바 있어서 세포 및 조직에 손상을 주지 않는 적절한 산화질소(II) 농도를 유지하는 것이 매우 중요하다(Sung 등, 2016). 따라서 세포 독성이 없는 농도에서 산화질소(II) 및 전염증성 사이토카인 생성의 증가는 체내 면역시스템을 활성화 시키는 것으로 판단할 수 있다. 앞선 결과에서 세포독성에 영향을 미치지 않는 농도인 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 CTPS를 처리하여 산화질소(II) 분비능을 평가하였을 때, 산화질소(II) 분비능이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되어 CTPS의 처리는 큰포식세포의 면역활성능을 증강시키는 것으로 사료된다.

활성화된 큰포식세포가 분비하는 사이토카인은 면역세포 간 상



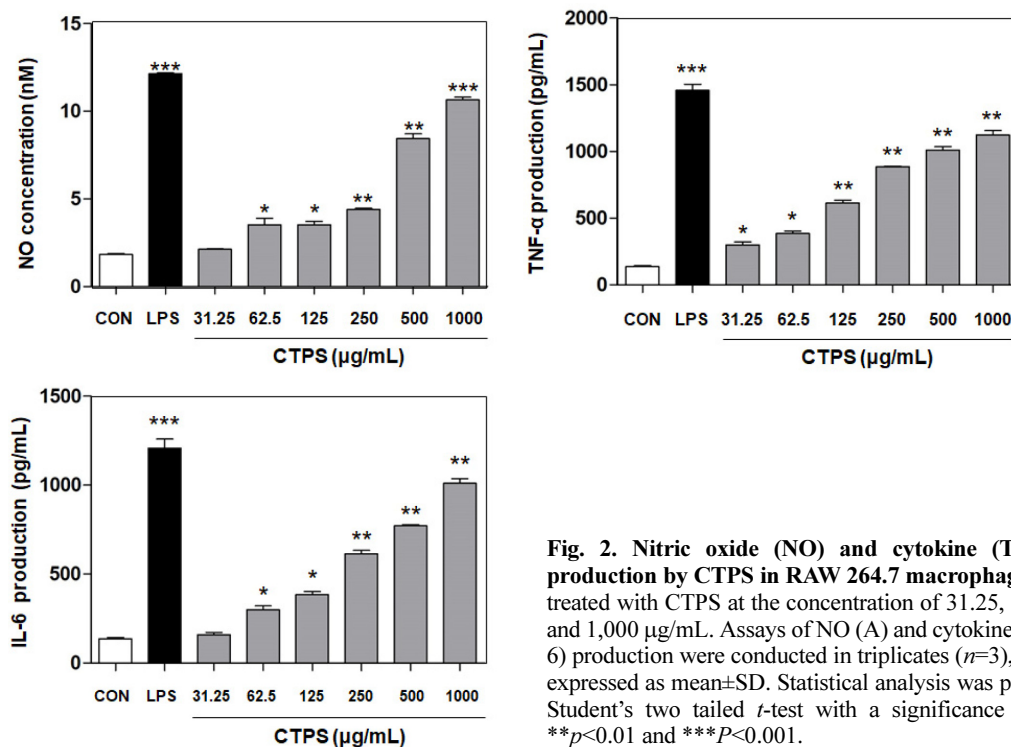
**Fig. 1. Cell proliferation activity of CTPS in RAW 264.7 macrophage cells.** Cells were treated with CTPS at the concentration of 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1,000  $\mu\text{g/mL}$ . Cell proliferation assay was conducted in triplicates ( $n=3$ ), and the results are expressed as mean $\pm$ SD.

호작용을 매개하여 신호전달을 위한 중요한 면역조절인자이며, 큰포식세포가 분비하는 사이토카인으로는 TNF- $\alpha$  및 IL-6 등이 있다. TNF- $\alpha$ 는 큰포식세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로 종양 세포에 대한 강력한 세포독성을 나타내기도 하며 외부 항원에 오염된 세포의 살해능력을 증가시켜 숙주의 감염부위를 국소화시켜 초기 면역반응에 중요한 역할을 수행한다(Kim 등, 2004). IL-6는 B 세포와 T 세포의 기능을 조절해 체액성반응을 조절하여 면역 글로불린의 합성에 관여하고, 조혈 작용을 활발하게 일어나게 하는 역할을 한다(Brewer 등, 1992).

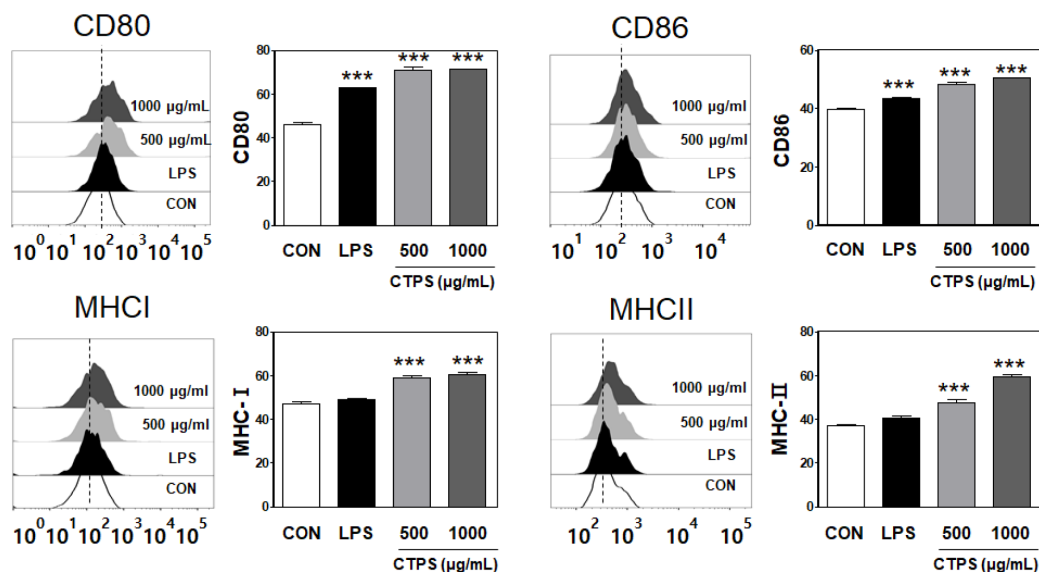
따라서 본 실험에서는 큰포식세포의 활성 지표인 사이토카인 (TNF- $\alpha$  및 IL-6)의 분비량을 통해서 큰포식세포의 활성화 정도를 알아본 결과, CTPS를 큰포식세포에 세포독성이 없는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 함량이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 보아 CTPS의 처리는 큰포식세포의 활성화를 유도하는 것으로 사료된다(Fig. 2).

### CTPS의 큰포식세포의 세포 표면 활성 인자에 미치는 영향

다양한 면역 세포구들은 세포 표면에 가지고 있는 표면 분자 구조에 따라 서로를 구분하며 이러한 구분은 분화집단(cluster of differentiation, CD)라는 표현형을 사용한다. 이러한 표현형인 CD는 같은 종류의 세포를 분리하거나 분석하는 연구에도 매우 유용하게 사용되며, 세포의 활성화와 관련하여 중요한 지표로 사용된다(Lee 등, 2001). CD80과 CD86은 세포의 활성화 되었을 때 가지는 표현형으로 이러한 분자의 발현이 증가하게 되면 항원제시능력이 증가하며 T 세포와의 세포 간 상호작용(cell to cell interaction)을 돕는 역할을 수행하므로 CD80과 CD86의 발현 증가는 수지상세포의 활성화와 매우 밀접한 관련이 있다(Mo 등, 2017). 또한 탐식세포가 병원체를 탐식하게 되면 후천면역을 담당하는 T 세포에게 병원체의 항원을 제시하게 되는데, 이때 항원을 제시하는 과정에서 직접적으로 제시할 수 없고 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex; MHC)를 통하여 항원을 결합시켜 전달한다(Piani 등, 2000). 주조직적합성 복합체로는 MHC class I과 II가 존재하며 큰포식세포와 같은 세포가 활성화되지 않았을 때는 적은 양의 발현이지만 면역세포들이 활성화가 되면 많은 양이 발현되어 후천성 면역세포인 T 세포에 많은 양의 항원을 전달할 수 있으며 T 세포를 활성화시켜 후천성 면역



**Fig. 2. Nitric oxide (NO) and cytokine (TNF- $\alpha$  and IL-6) production by CTPS in RAW 264.7 macrophage cells.** Cells were treated with CTPS at the concentration of 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1,000  $\mu$ g/mL. Assays of NO (A) and cytokine (B; TNF- $\alpha$ , C; IL-6) production were conducted in triplicates ( $n=3$ ), and the results are expressed as mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed  $t$ -test with a significance level of \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$ .



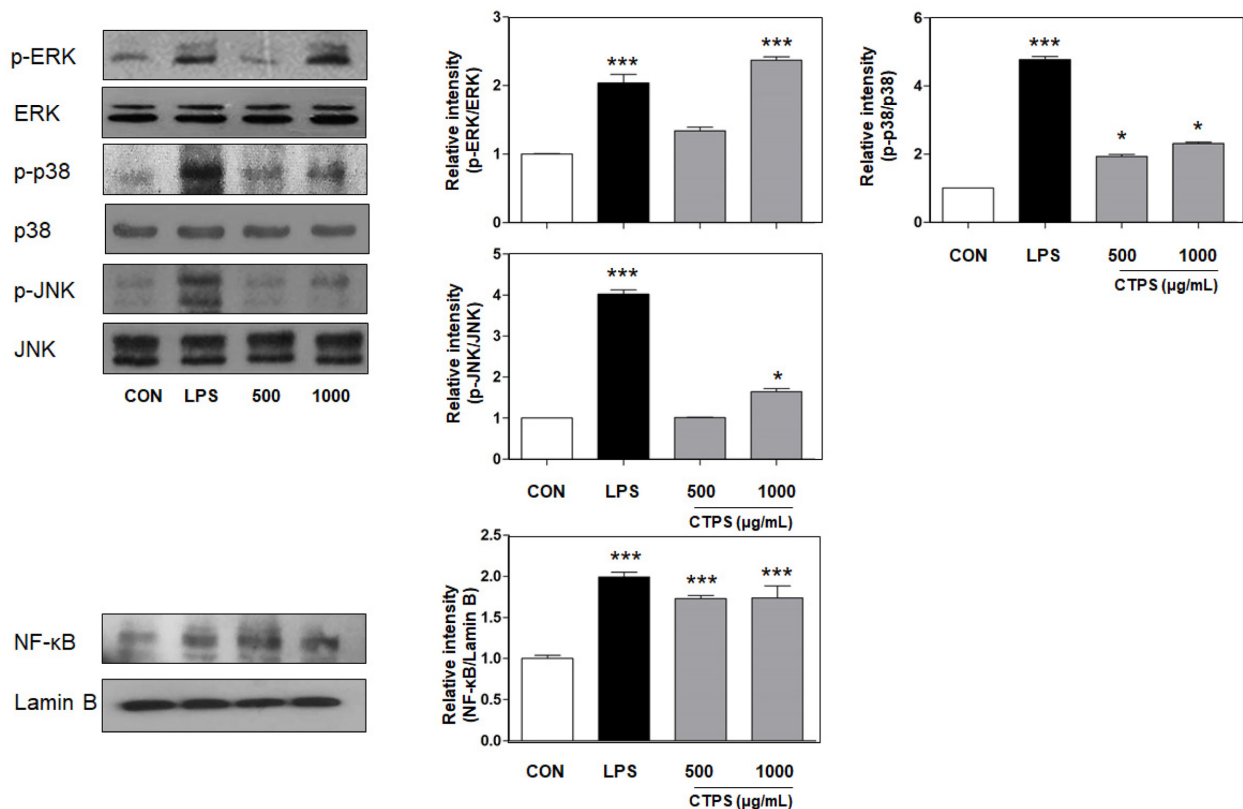
**Fig. 3. Expression of co-stimulatory (CD80, 86) and MHC class (I, II) molecules by CTPS in RAW 264.7 macrophage cell.** Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 200 ng/mL in RAW 264.7 cells. Cells were treated with CTPS at the concentration of 500 and 1,000  $\mu$ g/mL. Measurement of CD80, 86 and MHC class I, II were conducted in triplicates ( $n=3$ ), and the results are expressed as mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed  $t$ -test with a significance level of \*\*\* $p<0.001$ .

반응을 활발히 진행시킨다(Hege 등, 2003). 따라서 CD80, 86, MHC class I 및 II의 발현의 증가는 큰포식세포와 같은 탐식세포의 활성화에 매우 밀접한 관련이 있다(Piani 등, 2000). CTPS의 처리가 큰포식세포의 세포 표면 활성 인자의 발현량에 미치는 영향을 유세포 분석기를 통하여 관찰하였다(Fig. 3). CTPS를 농도별(500 및 1,000  $\mu$ g/mL)로 처리하여 CD80과 86 및 MHC class I과 II의 발현에 관하여 관찰한 결과 모든 CTPS 처리군에서 발현이 증가되는 것으로 관찰되었으며, 처리농도가 증가할수록

발현량이 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 CTPS의 처리는 큰포식세포의 세포 표면활성 인자들의 발현을 직접적으로 증가시켜 면역세포를 활성화시키는 것으로 사료된다.

#### CTPS의 MAPKs 및 NF-B의 인산화에 미치는 영향

외부 자극에 의해 면역반응이 유도되면 면역세포 내부의 신호 전달 체계가 활성화되며 산화질소(NO) 및 사이토카인과 같은 면역



**Fig. 4. Phosphorylation activity of CTPS on MAPKs and NF-κB in RAW 264.7 macrophage cells.** Cells were treated with CTPS at the concentration of 500 and 1,000  $\mu\text{g/mL}$  for 45 min. Cells lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting analysis was performed using each specific antibody to MAPKs (phospho-p38, phospho-ERK1/2, and phospho-JNK1/2), and NF-κB (p65). Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ .

매개 물질들의 분비가 촉진된다. 초기면역반응이 시작되면 면역 세포 내 신호전달에 관여하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 및 NF-κB의 인산화가 이루어지고, NF-κB가 활성화되면 면역 방어기작을 나타내는 사이토카인 및 산화질소(II)의 분비에 영향을 미치는 것으로 보고되어진다(Brewer 등, 1992). MAPKs에 속하는 대표적인 단백질에는 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), serine/threonine protein kinase (p38) 및 c-Jun NH2-protein kinase (JNK) 등의 3종이 있으며, 활성화된 MAPKs는 NF-κB로 면역 활성화의 신호를 전달하여 단백질 발현 및 세포소기관에 영향을 주게 된다(Cobb과 Goldsmith, 2000). 따라서 CTPS의 처리에 의한 큰포식세포 활성화의 명확한 면역기전을 알아보기 위하여 큰포식세포에 CTPS의 농도를 500 및 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 으로 고정하여 실험하였다. 큰포식세포에 CTPS를 처리하고 MAPKs 및 NF-κB의 인산화 정도를 관찰하였을 때, CTPS의 처리가 MAPK (ERK, p38 및 JNK) 및 NF-κB의 인산화와 핵 내 NF-κB의 발현이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 4). 따라서 본 연구에서 CTPS의 처리에 의하여 산화질소(II) 및 사이토카인의 분비가 증가되는 것은 MAPKs의 인산화로 핵 내 NF-κB의 활성이 증가되었기 때문인 것으로 사료된다.

## 요약

본 연구는 꾸지뽕 열매로부터 분리한 조다당류(CTPS)가 초기 면역반응에 중추적인 역할을 수행하는 큰포식세포에서 활성화를 유도하는지에 관한 여부를 알아보기 위하여 선천 및 적응면역에

서 중추적인 역할을 수행하는 큰포식세포에 CTPS를 처리하여 세포 증식률, 산화질소 분비능 및 사이토카인(TNF- $\alpha$  및 IL-6) 분비능이 증가되는 것을 확인하였다. 또한 활성화된 큰포식세포의 세포 표면에서 발현되는 CD80과 CD86의 발현과 탐식세포의 항원 제시에 밀접한 관련이 있는 주조직적합성 복합체(MHC class I 및 II)의 발현이 CTPS 처리구에서 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. 이러한 산화질소 분비능과 사이토카인의 증가 원인에 관한 면역기전 분석 결과, MAPKs의 인산화와 NF-κB의 핵 내 이동성을 증가시켜 면역활성을 증가시키는 것으로 관찰되었다.

## References

- Bios MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)
- 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)
- 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)
- Byun EB, Jang BS, Sung NY, Byun EH. Immunomodulatory activity of crude polysaccharide separated from *Cudrania tricuspidata* leaf. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 1099-1106 (2016)
- Cha JY, Kim HJ, Jun BS, Cho YS. Effects of water-extract of leaves from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentration of serum and liver in rats. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43: 303-308 (2000)
- Chen F, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*Folium mori*)



- and cortex mori radices in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi* 115: 476-482 (1995)
- Choi, SR, You, DH, Jang I, Ahn MS, Song EJ, Seo, S. Y, Choi MK, Kim YS, Kim MK. Choi DG. Cytotoxicity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau. *Korean J. Medicinal Corp Sci.* 20: 153-158 (2012)
- Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25: 7-9 (2000)
- Hano Y, Matsumoto Y, Sun JY, Nomura T. Structures of three new isoprenylated xanthenes, cudraxanthenes E, F and G. *Planta Med.* 56: 478-481 (1990)
- Hegde NR, Chevalier MS, Johnson DC. Viral inhibition of MHC class II antigen presentation. *Trends Immunol.* 24: 278-285 (2003)
- Jang IM. Treatise on Asian Herbal Medicines. Natural Products Science Seoul National University Press, Seoul, Korea (2003)
- Kang DG, Hur TY, Lee GM, Oh HC, Kwon TO, Sohn EJ, Lee HS. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sci.* 70: 2599-2609 (2002)
- Khawla BJ, Fatma C, Sameh M, Oumema NE, Claire BH, Raoudha EG. Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. *Food Chem.* 205: 97-105 (2016)
- Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* 569: 321-326 (2004)
- Kim J, Ryu HS, Shin JH, Kim HS. *In vitro* and *ex vivo* supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 167-175 (2005)
- Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim HM, Koshino H, Uramoto M, Yoo ID. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* 41: 213-216 (1996)
- 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)
- 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 Immun.* 67: 467-474 (2017)
- Ottersen T, Vance B, Doorenbos NJ, Chang BL, el-Ferally FS. The crystal structure of cudranone, 2,6,3'-trihydroxy-4-methoxy-2'-(3-methyl-2-butenyl)-benzophenone: a new antimicrobial agent from *Cudrania chochinensis*. *Acta. Chem. Scand. B* 31: 434-436 (1977)
- 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)
- Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Kim NH, Kim KH, Rhu EJ, Jeong YK. Effect of fermented *Cudrania tricuspidata* fruit extracts on the generation of the cytokines in mouse spleen cells. *J. Life Sci.* 23: 682-688 (2013)
- 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.* 49: 431-437 (2016)
- Youn KS, Kim JW. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activities of extracts from Mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit subjected to different drying methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1388-1394 (2012)
- Yu AR, Park HY, Kim YS, Ha SK, Hong HD, Choi HD. Immuno-enhancing effect of seed extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1671-1676 (2012)