

## Immunostimulatory Activity of Agarwood through Activation of MAPK Signaling Pathway in RAW 264.7 Murine Macrophages

Seon Yeong Ji<sup>1,2</sup>, Hyun Hwangbo<sup>1,2</sup>, Hyesook Lee<sup>1,2</sup>, Young Tae Koo<sup>3</sup>, Jin Soo Kim<sup>3</sup>, Ki Won Lee<sup>3</sup>, Dong Jin Noh<sup>3</sup> and Yung Hyun Choi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University, Busan 47227, Korea

<sup>3</sup>Natural Products Convergence R&D Division, Kwangdong Pharm Co. Ltd., Seoul 08381, Korea

Received July 6, 2021 / Revised July 22, 2021 / Accepted July 26, 2021

Deterioration of the immune function weakens the body's resistance to various infections, leading to a series of diseases. Immunomodulatory biomaterials have been used to reduce the side effects of immunosuppressants or to enhance immunity. Agarwood is the aromatic resinous portion of *Aquilaria* trees that has been traditionally used as a medicinal herb for the treatment of various diseases. Although previous studies have shown that agarwood can improve the body's immunity, evidence for this claim is still lacking. In this study, the immune-enhancing effects of the agarwood methanol extracts of *Aquilaria malaccensis* Lamk were evaluated in a RAW 264.7 macrophage model. Based on the results, the agarwood extracts markedly enhanced phagocytosis in the absence of cytotoxicity. The agarwood extract-treated RAW 264.7 cells exhibited the typical morphology of activated macrophages, which are spindle-shaped with elongated filopodia. Agarwood extract also significantly increased the production of nitric oxide (NO), which is associated with the increased expression of inducible NO synthase. Moreover, the secretion and expression levels of cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6, were increased by agarwood treatment. Notably, these are also associated with a mitogen-activated protein kinase signaling pathway. Taken together, our findings provide scientific evidence that agarwood has potential immune-enhancing effects *in vitro*.

**Key words** : Agarwood, cytokine, immune-enhancing activity, macrophages, mitogen-activated protein kinases

### 서 론

면역 반응은 바이러스, 박테리아, 기생충과 같은 외부 감염원과 인체 내 환경 변화로부터 유발된 질병 환경을 제거하고 복구하기 위한 가장 중요한 생물학적 방어 수단 중 하나이며 선천적 면역과 적응 면역으로 구분된다[7, 28]. 면역 반응에는 대식세포(macrophages), 자연 살해 세포(natural killer cells) 및 림프구(lymphocytes) 등과 같은 다양한 면역 세포의 활성화를 요구한다[28, 33]. 특히 신체의 모든 주요 기관에 분포되어 있는 대식세포는 중요한 선천성 면역 세포이며 침입하는 병원체와 종양 세포에 대한 첫 번째 방어선 역할을 한다[10, 27]. 활성화된 대식세포는 식작용(phagocytosis)을 강화하고 다른 면역 세포를 감염 부위로 유도하면서 산화질소(nitric oxide, NO) 및 다양한 면역 자극 cytokine을 생성하여 면역 활동

을 극대화하는 데 핵심적인 역할을 한다[10, 32, 46]. 따라서 대식세포는 면역 조절의 핵심 표적 세포로 간주된다. 임상에서 사용 중인 대부분의 면역 강화제는 주로 신체의 감염 저해 및 항종양 능력을 강화하여 면역 결핍을 교정하기 위하여 사용되고 있으며, 현재 isopropynosine 및 levamisole과 같은 합성 약물과 interferon이나 interleukin (IL) 등이 면역 강화제로 사용되고 있다. 그러나 이러한 약물들은 메스꺼움, 구토, 복통 및 기타 위장 장애를 포함한 많은 부작용을 일으킬 수 있다[17, 18]. 그동안 면역 조절 기능을 가진 천연물질들이 다양한 면역계 관련 질환의 치료나 면역 증진을 위해 광범위하게 사용되어 왔으며, 합성 약물에 비해 상대적으로 독성 및 부작용이 적은 장점을 지니고 있는 전통 약제들의 효능에 관한 재조명이 이루어지고 있다[36, 41].

침향(沈香, agarwood)은 서향나무과(Thymeleaceae family)에 속하는 침향나무(*Aquilaria* spp.)의 수지가 심재 부위에 침착하여 형성된 단단한 덩어리 모양인 수간목(resinous heartwood)으로 침수향(沈水香)이라고도 한다. 침향은 침향나무의 물리적 손상 또는 미생물 감염에 대한 방어 기전으로 자연적으로 형성되며, 향수 또는 향료로서 사용되어 왔으며, 진정제, 구충제, 천식, 심장 보호 및 진통 완화를 목적으로 오랫동안 사용되어왔다[5, 19, 48]. 침향나무에 속하는 종 중에서

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Aquilaria malaccensis* Lamk, *A. crassna* Pierre ex Lecomte, *A. sinensis* (Lour.) Gilg 및 *A. agallocha* Roxb.와 같은 종에서 침향의 구성 성분에 대한 연구가 비교적 광범위하게 이루어져 왔으며, 휘발성 성분인 저분자 방향족 화합물과 sesquiterpene 계열 물질 및 비휘발성 성분인 epoxide 2-(2-phenylethyl)chromone 유도체를 포함한 flavonoids, benzophenones, xanthenes, selinene 및 eudesmol 등이 주요 생리활성 물질로 밝혀지고 있다[9, 16, 25]. 최근 연구들에서 침향 추출물 또는 구성 성분들은 항산화, 항염증, 항암, 항허열, 항진균, 항박테리아, 항당뇨, 간 기능 개선 등과 같은 약리학적 효능이 있음이 추가로 보고되고 있다[11, 16, 21, 22, 25, 35]. 또한 Guo 등[14, 15]의 연구에 의하면 침향에서 분리된 epoxide 2-(2-phenylethyl)chromone 유도체인 GYF-21은 비정상적으로 과도한 염증반응을 억제하면서 다발성 경화증 및 전신성 홍반성 루푸스 치료에 유용할 수 있음을 보고한 바 있으며, 침향 유래 flavonoid의 일종인 pilloin 또한 과도한 염증반응을 억제하였다[40]. 그리고 Zheng 등[50]은 *A. agallocha* 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성을 통하여 5-fluorouracil로 유도된 장 점막염을 억제하였음을 보고한 바 있다. 그 외 몇몇 선행 연구에서 침향이 면역계 관련 질환의 개선 효과가 보고된 바 있으나[8, 38], 현재까지 침향의 면역 증진 효능에 관한 연구는 여전히 미비한 실정이다. 본 연구에서는 침향의 약리학적 효능의 재평가와 기존 연구의 연속적인 수행을 위하여 침향 추출물에 의한 면역 자극 활성 여부를 우선적으로 조사하였다. 이를 위하여 침향나무(*A. malaccensis*)에서 유래한 침향 메탄올 추출물을 대상으로 RAW 264.7 세포에서 식작용 활성과 염증성 매개인자 및 cytokine의 생성에 미치는 영향을 비교하였으며, 대조물질로서 홍삼 추출물과 lipopolysaccharides (LPS)를 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

마우스 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포는 한국세포주 은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Republic of Korea)에서 분양 받았으며 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 세포 배양에 필요한 모든 재료는 WelGENE Inc. (Gyeongsan, Republic of Korea)에서 구입하였다.

### 침향 추출물의 준비

본 연구에서 사용된 침향은 총 2종으로, 인도네시아 칼라만탄 정글지역에서 수집된 *A. malaccensis* 유래 침향 2종은 (주)광동제약(주)(Seoul, Republic of Korea)에서 제공받았다. 침향 메탄올 추출물을 분리하기 위하여 각각의 침향 원료를 건조시킨

후 분말화하였다. 그리고 1 l의 메탄올에 각각 100 g의 침향을 인큐베이터(SI-100R, 한양사이언스랩, Seoul, Republic of Korea) 내에서 25°C, 3시간 동안 진탕 추출하였다. 이후 감압농축기(NE-2001, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 60°C에서 농축한 후 동결건조기(FD8512, 일신바이오베이스, Dongducheon, Republic of Korea)를 이용하여 분리하였다. *A. malaccensis* 유래 침향 2종의 추출물은 각각 IDNL 및 IDNH로 표기하였다. 침향 추출물에 대한 대조물질로서 홍삼 추출물(red ginseng, RG) 사용하였으며, 본 연구에 사용된 홍삼 추출물은 건조 분말 1,000 g을 64% 에탄올로 80°C에서 10 l에 침치시켜 8시간 동안 전기약탕기(KS200S, ㈜경서이엔피, Incheon, Republic of Korea)로 추출한 후 동일한 방법으로 동결건조하였다. 침향 추출물은 dimethylsulfoxide (DMSO, Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, USA)에 100 mg/ml 농도로, 홍삼 추출물은 3차 증류수에 녹여 250 mg/ml 농도로 stock solution을 제조하였다. 또 다른 양성 대조물질인 *Escherichia coli* O55:B5 유래 lipopolysaccharides (LPS)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 3차 증류수에 용해하여 1 mg/ml의 stock solution으로 제조하였다. 각각의 추출물과 LPS는 적정 농도로 세포 배양용 배지에 희석하여 처리하였다.

### 침향 추출물이 RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 영향

침향 추출물과 대조물질인 홍삼 추출물 및 LPS의 면역 자극 활성 비교를 위한 조건의 설정을 위하여 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 수행하였다. 이를 위하여 6-well plate에 well 당  $5 \times 10^5$ 개의 RAW 264.7 세포를 분주하여 80%의 confluence에 도달하면, 농도별 각각의 추출물 및 LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well에 500 µg/ml 농도의 MTT 용액(Invitrogen-Gibco)을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 반응시켰다. 이어서 배지를 제거하고 DMSO를 처리하여 각 well에 형성된 formazan을 녹인 다음, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 각 추출물에 대한 세포 독성은 대조군 값을 기준으로 백분율로 환산하여 나타내었다. 아울러 각 추출물 및 LPS 처리에 따른 RAW 264.7 세포의 형태학적 변화를 위상차 현미경(inverted microscopy, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

### RAW 264.7 세포의 식작용 활성 측정

대식세포의 활성 지표인 식작용 활성은 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입한 Phagocytosis Assay Kit (catalog no. 500290)를 사용하여 제조사가 제시한 방법에 따라 측정하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 세포를 6-well plate에 well 당  $5 \times 10^5$ 개의 세포를 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 농도별 각각의 침향 추출물 및 대조물질을 처리하여 24시

간 추가 배양하였다. 이후, 형광 표지된 latex bead-rabbit IgG-FITC complex (Cayman Chemical Co.)를 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후, Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; WelGENE Inc.)로 세척하고 유세포 분석기(flow cytometer, BD Accuri C6 flow cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 식작용 활성을 정량적으로 비교하였다. 아울러 형광 현미경을 이용한 식작용 활성을 관찰하기 위하여 DPBS로 세척한 세포를 40  $\mu$ M의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 10분간 핵 염색을 실시한 후, 동의대학교 생체조직재생 핵심지원센터(Core-Facility Center for Tissue Regeneration)의 형광 현미경(Carl Zeiss) 하에서 RAW 264.7 세포의 식작용 활성을 평가하였다.

### NO 생성량의 측정

NO의 생성 정도를 조사하기 위하여 동일 조건에서 RAW 264.7 세포를 배양한 후, 세포 배양액을 수거하였다. 수거된 세포 배양액 100  $\mu$ l에 Griess reagent (1% sulfanilamide (Sigma-Aldrich Chemical Co.)가 포함된 5% phosphoric acid 50  $\mu$ l와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 50  $\mu$ l를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ , Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 농도별로 조제하여 NO의 생성 정도를 평가하였다.

### Cytokine 생성 양의 측정

동일 조건에서 배양된 RAW 264.7 세포가 생성한 cytokine의 양을 측정하기 위하여 세포 배양액 내의 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (catalog no. SMTA00B), IL-6 (catalog no. M6000B) 및 IL-1 $\beta$  (catalog no. MLB00C)의 함량을 각각의 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사가 제시한 방법에 따라 측정하였다.

### 단백질 분리 및 Western blot analysis

침향 추출물의 면역 활성 관련 기전 연구를 위한 단백질 발현의 조사를 위하여 100 mm dish에  $2.5 \times 10^6$ 개의 세포를 분주하고 24시간 배양 후 각 추출물 및 대조물질을 처리하였다. 처리 후 수확된 세포를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음 pellet에 1X lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylene-diamine-tetraacetic acid, 1% Nonidet P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 및 5 mM dithiothreitol]를 적정량 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시켰다 (해당 시약은 모두 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였음). 이후 4°C에서 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리

하여 상층액을 얻었으며, 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였고, 동량의 Laemilni sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 혼합하여 단백질 샘플을 만들었다. 동량의 샘플을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기 영동을 실시하였고, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. 그 후 5% skim milk를 30분간 처리하였고 1차 항체를 처리하여 4°C에서 over night 시킨 다음 1x PBS-T (PBS with Tween 20)로 10분간 3번 세척하였다. 그 후 membrane에 적정 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후 1x PBS-T로 세척 후 Fusion FX Image system (Vilber Lourmat, Torcy, France)를 이용하여 단백질의 발현 양상을 분석하였다. 본 연구에 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) 및 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, 단백질 발현의 정량적 분석은 ImageJ® software (v1.48, NIH, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 수행되었다.

### 통계 처리

GraphPad Prism® version 5.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)의 one-way ANOVA를 사용하여 통계 분석을 실시하였으며, Tukey's test로 사후 검정하여  $p < 0.05$  값을 유의한 값으로 처리하였다.

## 결과 및 고찰

### 침향 추출물 처리에 따른 RAW 264.7 세포의 형태 변화 관찰

대식세포는 다양한 조직에 분포한 면역계 식세포로, 주변 미세 환경 신호에 대한 반응으로 대식세포 분극화(macrophage polarization, MP)를 통해 다양한 표현형 및 기능을 획득한다[47, 49]. 대식세포는 초기 감염에 대한 반응으로 M1 표현형을 나타내며, 활성화된 M1 대식세포는 면역억제 세포의 저해, 염증 및 Th1 cytokine의 생성을 통해 Th1 반응을 촉진하여 병원균에 대한 숙주 방어 역할을 수행한다[34, 44]. 따라서, 대식세포의 M1 표현형 획득은 면역계 자극을 통한 인체 방어 체계를 강화하기 위한 핵심 전략 중 하나이다. 이에 침향이 대식세포 M1 표현형을 획득함으로써 면역 증진에 기여하는지 여부를 확인하기 위해 침향 추출물 2종 및 대조물질 2종을 RAW 264.7 세포에 처리한 후, 세포 모양의 변화를 관찰하였다. Fig. 1A에서 볼 수 있듯이, 아무런 약물을 처리하지 않은 대조군에서의 M0 세포는 세포질 확장이 없는 작고 둥근 형태를 띠는데 반해, 침향 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 세포 모양이 가늘고 긴 방추형 filopodia가 나타남을 확인할 수 있다. 이러한 세포 모양 변화는 M1 표현형의 대표적인 특징 [31, 43]으로 침향 추출물 2종 모두 5  $\mu$ g/ml 이상 농도에서

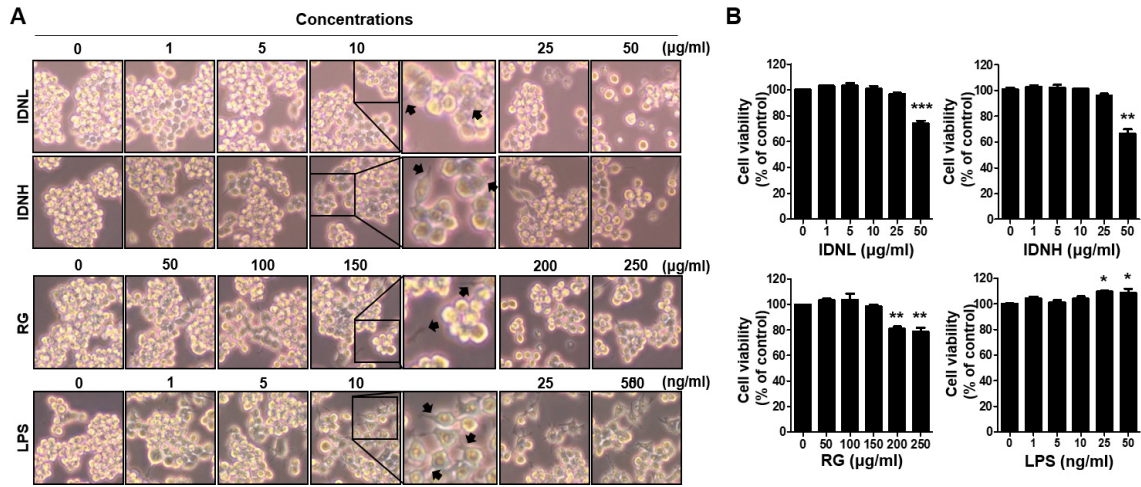


Fig. 1. Effects of agarwood extracts on the morphology and cell viability in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of agarwood methanol extracts (IDNL and IDNH), red ginseng ethanol extract (RG) and LPS for 24 hr. (A) The representative morphological changes of cells were taken using an inverted microscope (x50 magnification). Filopodia portions are indicated by arrows. (B) Cell viability was assessed by an MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD ( $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$  compared with the untreated cells). IDNL and IDNH are methanol extracts of agarwood taken from *A. malaccensis* Lamk, and VNL and VNH are methanol extracts of agarwood taken from *A. crassna* Pierre ex Lecomte.

filopodia가 관찰되었으며, 특히 *A. malaccensis* 유래 침향 메탄을 추출한 IDNH의 경우 10 µg/ml 처리 세포에서도 세포질 연장을 갖는 길쭉한 spindleoid가 확인되었다. 한편, 대조물질인 홍삼 추출물(RG)과 LPS 처리군에서는 각각 50 µg/ml과 1 ng/ml에서 M1 phenotype을 나타내었다. 이상의 형태학적 변화 관찰을 통해, 2종의 침향 추출물 모두 홍삼 추출물 대비 저농도에서도 M1 표현형을 획득하였음을 확인하였다.

**RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 침향 추출물의 영향**

Fig. 1A의 형태학적 결과를 바탕으로 침향 추출물에 의한 면역 자극 활성 여부의 조사를 위한 조건 설정을 위하여 RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 침향 추출물의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 동일한 조건에서 배양된 RAW 264.7 세포를 대상으로 MTT 분석을 실시한 결과, *A. malaccensis* 침향 메탄을 추출물인 IDNL과 IDNH는 25 µg/ml의 처리 농도까지 세포 생존율에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 50 µg/ml 처리군에서 각각 78%와 70%의 세포 생존율을 나타내어, 대조군 대비 유의적인 세포 독성을 보였다. 한편, 양성 대조군인 홍삼 추출물(RG)의 경우, 150 µg/ml 처리 농도까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으나 200 µg/ml 이상의 농도에서 유의적인 세포 독성을 보였고(대조군 대비 약 80%), LPS 처리군에서는 25 ng/ml 이상의 농도에서 경미한 세포 증식 증가를 보여주었다(Fig. 1B). 이상의 결과를 바탕으로 침향 추출물의 최고 처리 농도는 10 µg/ml로 설정하였으며, 홍삼 추출물은 150 µg/ml 이하로, LPS 처리 농도는 5 ng/ml로 설정하여 후속 실험을 수행하였다.

**RAW 264.7 세포에서 침향 추출물 처리에 의한 식작용 활성의 증가**

대식세포의 식작용은 활성화된 대식세포의 대표적인 특징으로, 병원체와 노화 세포의 흡수 및 분해에 중요한 역할을 하며, 면역 활성 증가의 지표로 활용된다[1, 20]. 따라서, 침향이 대식세포의 식작용을 증가시키는지를 확인하기 위해 침향 추출물 2종 및 대조물질 2종에 대한 식작용 활성을 평가하였다. Fig. 2A는 침향 추출물 2종의 식작용 활성을 유세포 분석을 통해 확인한 결과이며, 식작용 활성이 침향 추출물 처리 농도의존적으로 증가하였음을 알 수 있다. 특히, *A. malaccensis* 침향 메탄을 추출물인 IDNL과 IDNH가 10 µg/ml로 처리된 경우, RAW 264.7 세포의 식작용은 각각 2.6배 및 1.5배 증가하였다. 그리고 양성 대조군인 홍삼 추출물 150 µg/ml 처리군에서 4.1배 증가하였으며, LPS 5 ng/ml 처리군에서는 2.3배 정도 증가하였다(Fig. 3B, Fig. 3C). 그리고 유세포 분석 결과를 바탕으로, 침향 추출물 및 대조물질 처리에 따른 식작용 활성을 형광 현미경적 관찰로 재확인하였다. Fig. 3D에 제시한 결과에서 알 수 있듯이, 대조군에 비하여 침향 추출물 2종이 처리된 세포에서 FITC-IgG-positive 세포의 형광 강도가 모두 증가되었다. 아울러 홍삼 추출물 및 LPS 처리군에서도 유세포 분석 결과와 유사한 경향성을 보여주었다. 이상의 결과는 본 연구에서 사용된 침향 추출물이 세포 독성이 없는 범위에서 대식세포의 활성을 촉진시켰음을 의미하며, 이는 Fig. 1A에서 관찰된 RAW 264.7 세포의 형태학적 변화와 잘 일치된다.

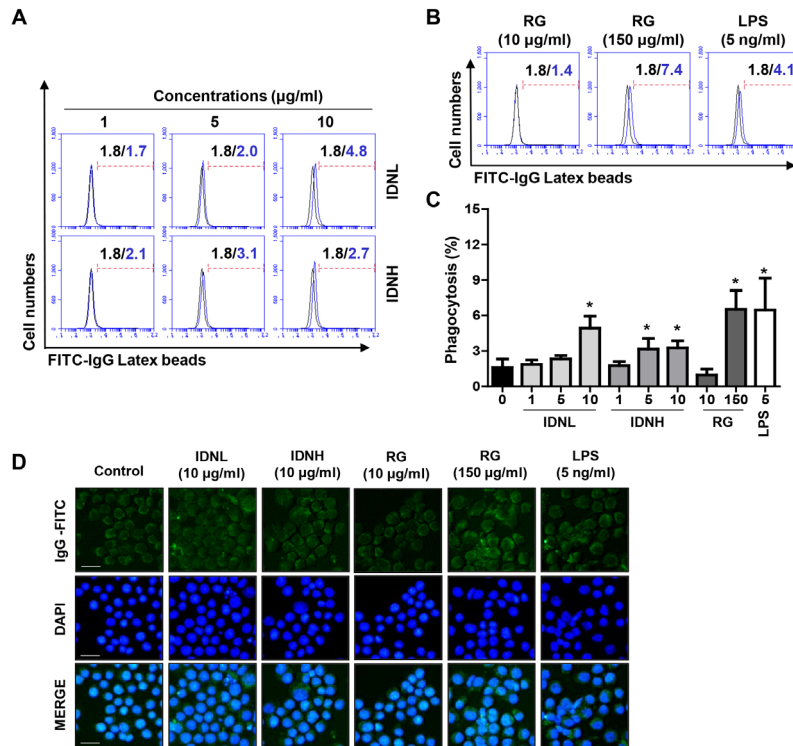


Fig. 2. Effect of agarwood extracts on the phagocytotic activity in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentration of IDNL, IDNH, RG and LPS for 24 hr. (A and B) Representative flow cytometry histograms of phagocytosis using fluorescent FITC-IgG latex beads are presented. (C) The results of quantitative analysis of phagocytosis using fluorescent FITC-IgG latex beads are shown. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $p < 0.05$  and  $***p < 0.001$  compared with the untreated cells). (D) The phagocytic cells were visualized by fluorescence microscopy. The nuclei were stained with DAPI (blue).

### RAW 264.7 세포에서 침향 추출물이 염증성 매개 인자의 생성에 미치는 영향

활성화된 M1 대식세포는 병원균에 대한 숙주 방어 역할의 수행을 위한 염증반응을 유도하기 위하여 염증성 복합체를 포식하며, 염증 유발 매개체(cytokines, chemokines, NO 등) 및 활성산소종(reactive oxygen species) 등을 생성한다[27, 37]. 특히 NO는 많은 생리 기능을 가진 중요한 세포 내 및 세포 간 조절 분자이며 면역 반응, 혈관 확장, 신경전달 및 혈소판 응집 억제에 포함하는 많은 생리적 역할을 수행한다[30]. 따라서, 침향에 의한 M1 대식세포 활성화에 따른 염증성 매개체의 생성과 분비를 조절하는지 여부를 조사하기 위해 대표적인 염증성 매개 인자인 NO의 생성 정도를 조사하였다. 이를 위하여 침향 추출물과 대조물질인 처리된 조건에서 RAW 264.7 세포를 배양한 후, 세포 배양액에 생성된 NO의 농도를 Griess reagent를 이용하여 조사하였다. Fig. 3A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, *A. malaccensis* 침향 메탄올 추출물(IDNL 및 IDNH) 처리군 모두에서 처리 농도 의존적으로 NO의 생성이 유의적으로 증가되었다. 그리고 양성 대조물질인 홍삼 추출물 처리군(100 및 150 µg/ml)에서도 대조군에 비하여 NO의 생성이 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었으며, LPS 처리군에

서는 대조군 대비 8배 이상의 증가를 보였다.

NO의 생성에 관여하는 NO synthesis (NOS)는 조직 특이적인 발현 양식을 보이는 3가지 isoform으로 크게 구분된다. 그중 neuronal NO synthase (nNOS, NOS1)와 endothelial NOS (eNOS, NOS3)는 신경 조직과 내피에서 지속적으로 발현되며, inducible NOS (iNOS, NOS2)는 활성화된 면역세포에서 발현이 증가된다[6, 29]. 따라서 Fig. 3A에서 나타난 결과가 iNOS의 발현 증가에 의한 것임을 확인하기 위하여 iNOS 발현 수준을 Western blot 분석을 통하여 조사한 결과, loading control로 사용된 actin 발현 대비 iNOS의 발현이 2가지 침향 추출물 처리(10 µg/ml)군에서 모두 유의적으로 증가하였으며, 홍삼 추출물 및 LPS 처리군에서도 NO 생성 수준의 증가와 유사한 경향성을 보여주었다(Fig. 3B, Fig. 3C). 따라서 본 연구의 결과는 침향 추출물의 처리에 의한 NO 생성의 증가는 iNOS 발현 증가와 연관성이 있음을 의미한다. NO와 함께 염증성 매개 인자 중의 하나이면서 필수적인 항상성 조절 인자인 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)는 cyclooxygenase (COX)의 활성화에 의하여 arachidonic acid로부터 생성된다. 특히 iNOS처럼 활성화된 대식세포에서는 inducible COX에 해당하는 COX-2의 발현이 증가되며, PGE<sub>2</sub>는 급성 염증 매개체를 억제

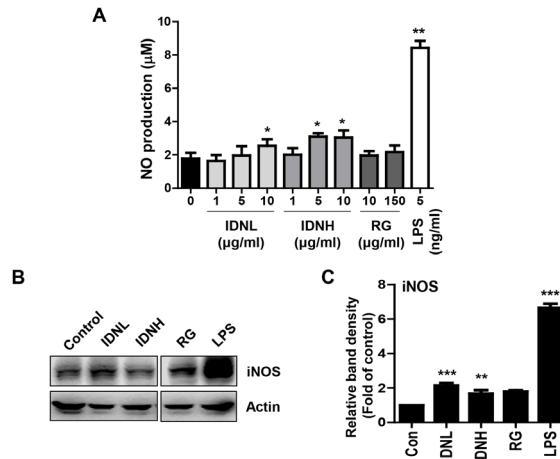


Fig. 3. Effect of agarwood extracts on the secretion of NO and expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentration of IDNL, IDNH, VNL, VNH, RG and LPS for 24 hr. (A) The amounts of NO in the cell supernatant were measured using Griess reagent. (B) The protein expression of M1 macrophage markers including iNOS and COX-2 was investigated by Western blot analysis. Actin was used as an internal control. (C) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. (A and C) Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 compared with the untreated cells).

하며 수지상 세포의 활성화와 조절 T 세포(regulatory T cell) 반응을 촉진하는 등 다양한 면역 패턴 조절자의 역할을 한다 [23, 39]. 따라서 침향 추출물이 PGE<sub>2</sub>의 생성에 관여하는 COX-2의 발현을 증가시킬 가능성을 조사한 결과, 홍삼 추출

물 및 LPS 처리군에서는 COX-2의 발현이 매우 증가되었으나 *A. malaccensis* 침향 메탄올 추출물인 IDNL과 IDNH 처리군에서는 COX-2의 발현 유도되지 않았다(Fig. 3B, Fig. 3D). 그러나 이러한 차이점이 생기는 이유에 관해서는 해당 추출물의 성분

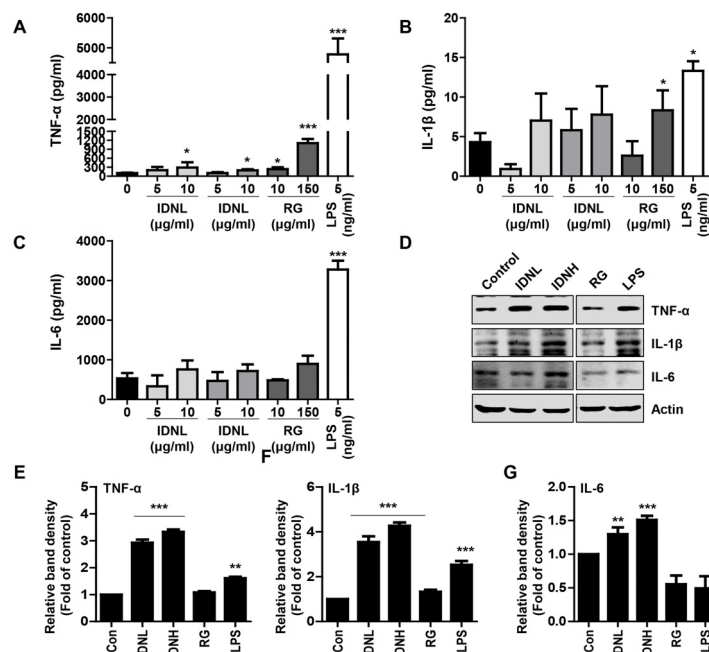


Fig. 4. Effect of agarwood extracts on the secretion and expression of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentration of IDNL, IDNH, RG and LPS for 24 hr. (A-C) The levels of TNF-α (A), IL-1β (B) and IL-6 (C) in the cell supernatant were measured with ELISA kits. (D) The protein expression of TNF-α, IL-1β and IL-6 was investigated by Western blot analysis. Actin was used as an internal control. (E-F) The expression of each protein was indicated as a fold change relative to the control. (A-C and D-G) Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 compared with the untreated cells).

비교에 따른 추가적인 연구의 수행이 요구된다.

물 처리군에서 높은 경향성을 보여주었다.

**RAW 264.7 세포에서 침향 추출물이 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향**

많은 선행 연구에서 잘 알려진 바와 같이 활성화된 대식세포는 다양한 cytokine의 분비를 통하여 면역 조절을 포함한 생리적 방어 기전을 수행한다[3, 4]. 이들 cytokine의 생성 증가는 염증성 매개 인자의 생성을 증가시키기 위한 신호 분자로서 작용도 하지만, 염증성 매개 인자에 의하여 cytokine의 생성이 유도되기도 한다[2, 24]. 따라서 침향 추출물에 의한 대식세포의 활성화에 따른 염증성 cytokine의 생성 변화를 조사하기 위하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생성 양을 각각의 cytokine ELISA kit를 사용하여 조사하였다. Fig. 4A에 제시하였듯이, 침향 추출물 2종은 모두 처리 농도 의존적으로 TNF- $\alpha$  분비를 증가시켰으며, 이는 또한 TNF- $\alpha$  단백질 발현의 수준 증가와 연관성이 있었다(Fig. 4D, Fig. 4E). 아울러 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 경우 침향 추출물의 종류 및 처리 농도에 따른 차이는 있었지만, 10  $\mu$ g/ml 처리군에서 홍삼 추출물 150  $\mu$ g/ml 처리군과 유사한 수준의 증가를 보여주었다(Fig. 4D, Fig. 4F, Fig. 4G). 그리고 비록 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 생성의 정도와는 차이가 다소 있지만, IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 단백질 발현 수준에서는 전체적으로 침향 추출

**RAW 264.7 세포에서 침향 추출물이 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호 전달계에 미치는 영향**

대식세포의 활성화는 다양한 세포 내 다양한 신호 전달 신호계의 상호작용을 통해 조절된다[13, 42]. 특히 이 과정에서 MAPKs 신호 전달 경로의 활성화는 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) 와 같은 전사인자의 활성을 유도하여 M1 대식세포에서 염증성 매개체의 생성을 유도한다는 사실이 입증되었다[12, 26, 45]. MAPKs는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38을 포함하며, 일반적으로 ERK는 성장 인자와 mitogen에 의해 활성화되는 반면, 세포 스트레스와 염증성 cytokine은 JNK와 p38을 활성화하는 것으로 알려져 있으나, 각각의 kinase 활성은 외인성 자극의 종류에 상이적으로 반응할 수 있다[4, 45]. 따라서, 본 연구에서는 침향의 면역 증진 효능에 MAPKs 신호계의 활성이 관여하는지를 조사하기 위하여 각각의 kinase가 활성화되었음을 의미하는 인산화 여부를 평가하였다. 먼저 10  $\mu$ g/ml의 IDNL가 처리된 RAW 264.7 세포에서는 IDNL 처리 15분 뒤부터 1시간 동안 ERK의 인산화를 대조군 대비 약 2.5배~3배 정도 증가되었으며 이후 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 5). 그리

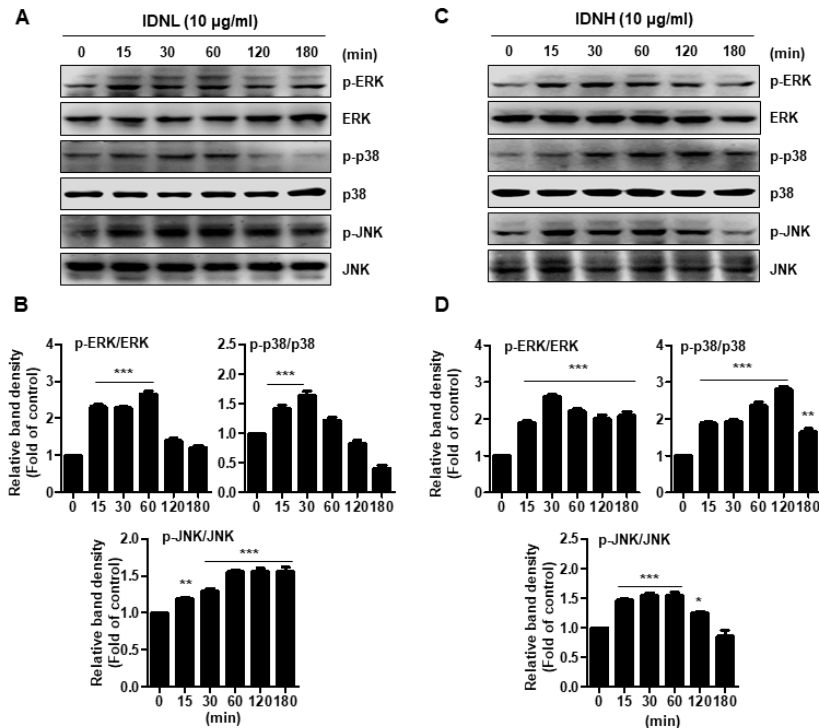


Fig. 5. Activation of MAPKs signaling pathway by agarwood extracts (IDNL and IDNH) in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with 10  $\mu$ g/ml of IDNL and IDNH for the indicated times. (A and C) Total cell lysates were examined by Western blotting for the phosphorylation of ERK, JNK and p38. (B and D) Bar graphs represent the relative band density of the phosphorylated/unphosphorylated protein ratio in Western blot analysis. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$  compared with the untreated cells).

고 p38의 인산화 역시 IDNL 처리 15분부터 급격히 증가하여 30분에 최고 수준을 보여주었으며, 이후 서서히 감소하였고, JNK의 인산화는 IDNL 처리 15분부터 유의적으로 증가하여 3시간째까지 유지되었다. IDNH는 처리 15분째 대조군 대비 약 2배, 30분째 약 2.6배가량의 ERK 인산화를 유도하였으며, 이후 3시간까지 ERK의 활성이 지속적으로 유지되었다. p38의 활성화 역시 IDNH 노출 15분 뒤부터 증가하여 2시간째 최고치에 보여주었으며, 3시간째 다소 감소하는 경향을 보였으나 그 발현 정도는 대조군과 비교하여 유의적으로 높은 수준이었다. 그리고 JNK의 인산화는 처리 후 1시간 동안 급격히 증가하였으며 2시간째부터 감소하는 경향을 보여주었다(Fig. 5). 이상의 결과는 RAW 264.7 세포에서 침향의 면역 증진 효능에는 추출물 종류에 따른 약간의 차이는 있지만 전체적으로 MAPKs의 활성화가 관여하였음을 의미한다.

본 연구에서는 다양한 약리적 효능을 가진다고 알려진 침향의 면역 증진 효과를 조사하였다. 이를 위하여 인도네시아에서 구입한 각각 2가지 침향 메탄올 추출물을 사용하였으며, 대조물질로서 홍삼 추출물 및 LPS를 사용하였다. 본 연구의 결과에 의하면, RAW 264.7 세포에서 2가지 종류의 침향 추출물 모두 세포 독성이 없는 저농도에서 M1 phenotype의 특징인 형태적 변형을 유도하였고 식작용 활성을 증가시켰으며, 이러한 효과는 *A. malaccensis* 유래 침향에서 서로 유사하였다. 그리고 본 연구에 사용된 침향 추출물은 염증성 매개 인자와 cytokine의 생성을 처리 농도 의존적으로 증가시켰으며, 이는 각 생성물의 조절인자 발현의 증가와 연관성이 있었으며, *A. malaccensis* 유래 침향이 우수한 분비능을 보였다. 또한 침향 추출물에 의한 면역 증진 효과는 MAPKs 신호 전달계의 활성이 관여하고 있음을 확인하였다. 비록 본 연구의 결과가 침향의 면역 증진 가능성을 보는 줄 수 있는 근거로서 활용이 될 수 있으나, 보다 정확한 기전 연구의 수행을 위한 각 침향 추출물의 생리활성 성분 분석과 *in vivo* 모델에서의 효능 검증이 이루어져야 할 것이다. 아울러 본 연구에서 확인된 M1 phenotype 유도에 관련된 유전자들의 발현 변화와 MAPKs 신호계를 중심으로 한 상위 및 하위 신호 전달계의 역할도 규명되어야 할 것이다. 따라서 본 연구 결과는 침향의 추가적인 생리활성을 연구하는 기초 자료로 활용될 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 광동제약(주)의 연구개발비 지원으로 수행된 연구 결과임.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

- Aderem, A. and Underhill, D. M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593-623.
- Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, I., Peychev, L., Trica, B., Oancea, F., Delattre, C. and Kokova, V. 2020. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. *Polymers (Basel)* **12**, 2338.
- Arabpour, M., Saghazadeh, A. and Rezaei, N. 2021. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Int. Immunopharmacol.* **97**, 107823.
- Barton, G. M. and Ruslan, M. 2009. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**, 1524-1525.
- Bhore, S. J., Preveena, J. and Kandasamy, K. I. 2013. Isolation and identification of bacterial endophytes from pharmaceutical agarwood-producing *Aquilaria* species. *Pharmacognosy Res.* **5**, 134-137.
- Bogdan, C. 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* **36**, 161-178.
- Chaplin, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 3-23.
- Chen, C. A., Liu, C. K., Hsu, M. L., Chi, C. W., Ko, C. C., Chen, J. S., Lai, C. T., Chang, H. H., Lee, T. Y., Lai, Y. L. and Chen, Y. J. 2017. Daphnoretin modulates differentiation and maturation of human dendritic cells through down-regulation of c-Jun N-terminal kinase. *Int. Immunopharmacol.* **51**, 25-30.
- Chen, H. Q., Wei, J. H., Yang, J. S., Zhang, Z., Yang, Y., Gao, Z. H., Sui, C. and Gong, B. 2012. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants. *Chem. Biodivers* **9**, 236-250.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J. and Zhao, L. 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204-7218.
- Dahham, S. S., Hassan, L. E., Ahamed, M. B., Majid, A. S., Majid, A. M. and Zulkepli, N. N. 2016. *In vivo* toxicity and antitumor activity of essential oils extract from agarwood (*Aquilaria crassna*). *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 236.
- Du, L., Li, J., Zhang, X., Wang, L., Zhang, W., Yang, M. and Hou, C. 2019. Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway activation. *Food Nutr. Res.* **23**, 63.
- Fan, R., Zhu, C., Qiu, D., Mao, G. and Zeng, J. 2020. Activation of RAW264.7 macrophages by an acidic polysaccharide derived from *Citrus grandis* 'Tomentosa'. *Int. J. Biol. Macromol.* **156**, 1323-1329.
- Guo, R., Li, J., Gu, Y., Li, Y., Li, S., Gao, X., Zhu, Z. and Tu, P. 2019. GYF-21, an epoxide 2-(2-phenethyl)-chromone derivative, suppresses dysfunction of B cells mainly via inhibiting BAFF activated signaling pathways. *Int. Immunopharmacol.* **67**, 473-482.
- Guo, R., Zhao, Y. F., Li, J., Gu, Y. F., Huo, H. X., Li, S.



- S., Song, Y. L., Zhu, Z. X. and Tu, P. F. 2017. GYF-21, an epoxide 2-(2-phenethyl)-chromone derivative, suppresses innate and adaptive immunity *via* inhibiting STAT1/3 and NF-kappaB signaling pathways. *Front. Pharmacol.* **8**, 281.
16. Hashim, Y. Z., Kerr, P. G., Abbas, P. and Mohd Salleh, H. 2016. *Aquilaria* spp. (agarwood) as source of health beneficial compounds: A review of traditional use, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **189**, 331-360.
  17. Hricik, D. E. 2015. Transplant immunology and immunosuppression: core curriculum 2015. *Am. J. Kidney Dis.* **65**, 956-966.
  18. Hu, Z., Ott, P. A. and Wu, C. J. 2018. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 168-182.
  19. Huang, J. Q., Wei, J. H., Zhang, Z., Yang, Y., Liu, Y. Y., Meng, H., Zhang, X. L. and Zhang, J. L. 2013. Historical records and modern studies on agarwood production method and overall agarwood production method. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **38**, 302-306.
  20. Jain, N., Moeller, J. and Vogel, V. 2019. *Mechanobiology* of macrophages: How physical factors coregulate macrophage plasticity and phagocytosis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **21**, 267-297.
  21. Jermisri, P. and Kumphune, S. 2012. Ethylacetate extract of *Aquilaria crassna* preserve actin cytoskeleton on stimulated ischemia induced cardiac cell death. *J. Med. Plants Res.* **21**, 4057-4062.
  22. Kakino, M., Sugiyama, T., Kunieda, H., Tazawa, S. and Maruyama, H. 2012. Agarwood (*Aquilaria crassna*) extracts decrease high-protein high-fat diet-induced intestinal putrefaction toxins in mice. *Pharm. Anal. Acta.* **26**, 1-7.
  23. Kalinski, P. 2012. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* **188**, 21-28.
  24. Kudrin, A. and Ray, D. 2008. Cunnig factor: macrophage migration inhibitory factor as a redox-regulated target. *Immunol. Cell Biol.* **86**, 232-238.
  25. Li, W., Chen, H. Q., Wang, H., Mei, W. L. and Dai, H. F. 2021. Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: chemistry, biological activities and biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **38**, 528-565.
  26. Liu, C. P., Zhang, X., Tan, Q. L., Xu, W. X., Zhou, C. Y., Luo, M., Li, X., Huang, R. Y. and Zeng, X. 2017. NF- $\kappa$ B pathways are involved in M1 polarization of RAW 264.7 macrophage by polyporus polysaccharide in the tumor microenvironment. *PLoS One* **12**, e0188317.
  27. Locati, M., Curtale, G. and Mantovani, A. 2020. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu. Rev. Pathol.* **15**, 123-147.
  28. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W. and Kim, H. L. 2018. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **14**, 49.
  29. Mattila, J. T. and Thomas, A. C. 2014. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front. Immunol.* **5**, 478.
  30. Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
  31. Mylvaganam, S., Freeman, S. A. and Grinstein, S. 2021. The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis. *Curr. Biol.* **31**, R619-R632.
  32. Nathan, C. 2012. Secretory products of macrophages: Twenty-five years on. *J. Clin. Invest.* **122**, 1189-1190.
  33. Nicholson, L. B. 2016. The immune system. *Essays Biochem.* **60**, 275-301.
  34. Parihar, A., Eubank, T. D. and Doseff, A. I. 2010. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J. Innate. Immun.* **2**, 204-215.
  35. Pranakhon, R., Pannangpetch, P. and Aromdee, C. 2011. Antihyperglycemic activity of agarwood leaf extracts in STZ-induced diabetic rats and glucose uptake enhancement activity in rat adipocytes. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **33**, 405-410.
  36. Rahman, M. M., Mosaddik, A. and Alam, A. K. 2021. Traditional foods with their constituent's antiviral and immune system modulating properties. *Heliyon* **7**, e05957.
  37. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T. and Sahebkar, A. 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell Physiol.* **233**, 6425-6440.
  38. Surjanto, S., Batubara, R. and Rangkuti, D. S. 2019. Safety test of agarwood leaves tea (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) through skin sensitization test on albino rabbit. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **7**, 3896-3899.
  39. Tang, E. H., Libby, P., Vanhoutte, P. M. and Xu, A. 2012. Anti-inflammation therapy by activation of prostaglandin EP4 receptor in cardiovascular and other inflammatory diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **59**, 116-123.
  40. Tsai, Y. C., Wang, S. L., Wu, M. Y., Liao, C. H., Lin, C. H., Chen, J. J., Fu, S. L. and Pilloin, A. 2018. Flavonoid isolated from *Aquilaria sinensis*, exhibits anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*. *Molecules* **23**, 3177.
  41. Tu, Y., Yang, Y., Li, Y. and He, C. 2021. Naturally occurring coumestans from plants, their biological activities and therapeutic effects on human diseases. *Pharmacol. Res.* **169**, 105615.
  42. Varin, A. and Gordon, S. 2009. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology* **214**, 630-641.
  43. Vogel, D. Y., Heijnen, P. D., Breur, M., de Vries, H. E., Tool, A. T., Amor, S. and Dijkstra, C. D. 2014. Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* **11**, 23.
  44. Wang, Y., Smith, W., Hao, D., He, B. and Kong, L. 2019. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *Int. Immunopharmacol.* **70**, 459-466.
  45. Wang, N., Liang, H. and Zen, K. 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front. Immunol.* **5**, 614.
  46. Wynn, T. A., Chawla, A. and Pollard, J. W. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445-455.

47. Yang, H. C., Park, H. C., Quan, H. and Kim, Y. 2018. Immunomodulation of biomaterials by controlling macrophage polarization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1064**, 197-206.
48. Ye, W., He, X., Wu, H., Wang, L., Zhang, W., Fan, Y., Li, H., Liu, T. and Gao, X. 2018. Identification and characterization of a novel sesquiterpene synthase from *Aquilaria sinensis*: An important gene for agarwood formation. *Int. J. Biol. Macromol.* **108**, 884-892.
49. Yunna, C., Mengru, H., Lei, W. and Weidong, C. 2020. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* **877**, 173090.
50. Zheng, H., Gao, J., Man, S., Zhang, J., Jin, Z. and Gao, W. 2019. The protective effects of *Aquilariae lignum Resinatum* extract on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Phytomedicine* **54**, 308-317.

---

### 초록 : RAW 264.7 대식세포에서 MAPKs 신호 전달 경로의 활성화를 통한 침향의 면역 자극 활성

지선영<sup>1,2</sup> · 황보현<sup>1,2</sup> · 이혜숙<sup>1,2</sup> · 구영태<sup>3</sup> · 김진수<sup>3</sup> · 이기원<sup>3</sup> · 노동진<sup>3</sup> · 최영현<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>동의대학교 향노화연연구소, <sup>2</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>3</sup>광동제약(주) 천연물융합연구개발본부)

면역 기능의 저하는 각종 감염에 대한 저항력의 부족을 초래하여 다양한 질병 유발에 기여하며, 면역 억제제의 부작용을 감소시키거나 면역력을 높이기 위해 면역 조절 생체 물질이 사용되고 있다. 침향은 침향나무의 방향족 수지 부분이며 전통적으로 다양한 질병을 치료하기 위한 목적으로 사용되어왔다. 비록 선행 연구들에 의하여 침향이 신체의 면역력을 향상시킬 수 있다는 사실이 밝혀졌지만 이에 대한 근거는 여전히 부족한 실정이다. 본 연구에서는 인도네시아에서 구입한 *A. malaccensis* 침향 메탄올 추출물의 면역 자극 효과를 RAW 264.7 대식세포 모델에서 평가하였다. 본 연구의 결과에 의하면 침향 추출물은 세포 독성이 없는 조건에서 식작용을 현저하게 향상시켰으며다. 또한 침향 추출물 처리된 RAW 264.7 세포는 활성화된 대식세포의 전형적인 형태를 보였으며, iNOS 발현 증가에 따른 NO 생성의 생성을 크게 증가시켰다. 아울러 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6과 같은 cytokine의 발현과 분비를 증가시켰으며, MAPKs 신호 전달 경로를 활성화시켰다. 따라서 본 연구의 결과는 고대 서적을 기반으로 침향의 효과를 확인하는 데 중요한 의미가 있으며, 침향이 잠재적인 면역 강화 효과가 있다는 근거를 제시하는 것이다.