

진피로부터 분리한 다당의 대식세포를 통한 면역증진 효과

이 경 애 · *박 혜 령*

안양대학교 식품영양학과 교수, *경희대학교 한방생명공학과 학술연구교수

Immuno-Enhancing Effects through Macrophages of Polysaccharides Isolated from Citrus Peels

Kyung-Ae Lee and †Hye-Ryung Park*

Professor, Dept. of Food and Nutrition, Anyang University, Anyang 14028, Korea

*Research Professor, Graduate School of Biotechnology, and College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea

Abstract

This study was designed to investigate the intracellular signaling pathways and immunoenhancing effect of macrophage activation by crude polysaccharides (CPP) extracted from citrus peels. CPP did not affect the cytotoxicity of RAW264.7 cells, but showed dose-dependent effects on cell viability. Also, CPP showed high production of chemokine (nitric oxide (NO)) and cytokines (interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α). CPP increased IL-6, TNF- α , and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression dose-dependently. CPP also strongly induced the phosphorylation of the ERK, p38, and I κ B α pathways in RAW 264.7 cells. In anti-pattern recognition receptors (PRRs) experiments, the effect of CPP on NO production was strongly suppressed by neutralizing toll-like receptor (TLR)2, TLR4, and Dectin1 antibodies, whereas IL-6 and TNF- α production by CPP was mainly suppressed by mannose receptor (MR). Therefore, these results suggest that CPP treatment-induced NO production was regulated by the ERK, p38, and NF- κ B pathways through TLR2, TLR4, and Dectin1 receptors, whereas IL-6 and TNF- α production was primarily regulated by the ERK, p38, and NF- κ B pathways through MR receptors.

Key words: citrus peel, polysaccharide, macrophage, signaling pathway

서 론

대식세포는 감염에 대한 숙주 방어 시스템에서 중요한 역할을 한다. 외부의 병원성 물질 침입에 대해 대식세포가 나타내는 반응 중 하나는 이물질을 감지하여 우리 몸에 있는 면역 세포(예: 대식세포 및 수지상 세포)를 활성화한다(Iwasaki & Medzhitov 2010; Kwak 등 2017). 병원체가 상피 방어를 통과하여 인체에 침입하면 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)라는 막 수용체를 통해 미생물(병원체)을 인식할 수 있다. 특히, 대식세포 표면에 존재하는 PRRs는 Toll-like receptor(TLR), CD14, scavenge receptor(SR), dectin-1 및 mannose receptor(MR)는 lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid, β -glucan 및 mannan 등이 있다고

알려져 있다 (Huang 등 2009; Kawai & Akira 2010). PRRs를 통해 발생하는 신호는 대식세포를 활성화하여 nitric oxide (NO), reactive oxygen species(ROS), interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-12, tumor necrosis factor(TNF)- α 와 같은 다양한 cytokine 및 chemokine을 분비함으로써 병원체를 제거하고 나아가 적응 면역 체계를 조절한다(MacMicking 등 1997; Forman & Torres 2002). 최근 여러 연구에서 식물체 또는 식용 버섯 다당류가 대식세포 표면에 존재하는 TLR2, TLR4, dectin-1 및 MR을 통해 세포내 신호전달경로를 경유하여 대식세포의 활성화를 향상시킨다고 보고된 바 있다 (Schepetkin & Quinn 2006; Deng 등 2018; Shin 등 2018; Wang 등 2018).

우리나라의 대표 과일인 감귤은 한라봉, 천혜향, 황금향

† Corresponding author: Hye-Ryung Park, Research Professor, Graduate School of Biotechnology, and College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea. Tel: +82-31-201-5634, E-mail: hrpark8512@khu.ac.kr

과 같은 다양한 citrus 중에서 한해 총 생산량이 2019년 기준, 약 52만톤으로 가장 많으며, 국내 감귤은 대부분이 제주도에서 재배되고 있다 (Kim 등 2021). 특히, 한방에서 진피라 불리는 감귤의 껍질은 중국, 일본, 한국에서는 수천년 이상 전통의학의 주요 공급원 중 하나로 이용되고 있지만, 그 수요는 작기 때문에 현재는 대부분 농산부산물로써 버려지고 있는 실정이다. 그러나 최근 감귤에 naringin, hesperidin, vitamin C, folic acid 및 pectin과 같은 다양한 성분들이 anti-cancer, anti-adipogenic, 및 antimicrobial activities와 같은 다양한 생물학적 활성을 나타낸다고 발표되면서 그 관심이 높아지고 있다(Kandaswami & Middleton 1994; Montanari 등 1998). 이러한 생리활성은 주로 진피의 저분자 물질에서 주로 연구가 활발히 이루어졌는데 진피는 저분자 물질뿐만 아니라 고분자 물질인 펙틴도 다량 함유하고 있다고 알려지면서 관심이 더 집중되고 있다. 펙틴의 구조는 homogalacturonan(HG), rhamnogalacturonan(RG)-I 및 RG-II으로 구성되어 있는데 (Kačuráková & Wilson 2001; Doco 등 2003; Yapo 등 2007), 예전에는 HG 영역만 연구가 이루어지다 분석기술이 발전하면서 RG-I과 RG-II가 존재하는 것을 확인하였고 HG 영역보다는 오히려 RG-I 및 RG-II 영역에서 중앙 전이 억제, NK 세포 활성화 및 대식세포 자극 활성과 같은 다양한 생물학적 활성이 나타난다고 보고되었다(Lee 등 2014; Shin 등 2016; Shin 등 2018).

따라서, 본 연구에서는 진피로부터 펙틴 다당을 분리하고, 대식세포 활성화의 세포내 신호전달 경로를 확인함으로써 면역증진 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 추출

본 연구를 진행하기 위해 사용된 진피는 2019년에 수확된 감귤로부터 얻어 열풍건조하였고, 다당 추출을 위해 분쇄하여 보관하였다. 진피로부터 다당을 분리하기 위해 건조된 진피 100 g에 20배의 증류수를 가하고, 총 양의 절반이 될 때까지 열수추출하였다. 이후 거즈를 이용하여 불용성물질을 제거하고 상등액에 4배의 에탄올을 첨가하여 교반하면서 침전물을 얻었다. 원심분리를 이용하여 침전물과 상등액을 분리하고, 상등액은 제거하였으며, 침전물은 다시 소량의 물에 용해하여 투석을 3일간 진행하였으며, 농축 및 동결건조를 거쳐 진피 유래 열수추출 조다당 CPP를 얻었다.

2. 구성당 분석

구성당 분석은 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 유도체화하여 high per-

formance liquid chromatography(HPLC)로 시료의 구성당을 분석하는 방법(Honda 등 1989)으로, 시료에 2 M TFA (trifluoroacetic acid)(Sigma-Aldrich)를 첨가하여 121°C에서 1.5시간 가수분해하여 N₂ flushing으로 건조한 뒤, 0.3 M NaOH 100 µL와 0.5 M PMP in methanol을 120 µL씩 분주하여 70°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나고 0.3 M HCl를 이용하여 중화한 후, 이를 완전히 건조한 뒤, 클로로포름과 물을 이용하여 2상 용매계로 분리하고 물층을 회수하는 과정을 4회 반복하였다. 그 다음, 0.22 µm filter를 이용하여 여과한 후 C18 컬럼이 장착된 HPLC-UV로 분석하였다. 용매는 phosphate buffer(pH6.7)와 acetonitrile(ACN)을 각각 82:18로 혼합하여 사용하였으며, 흡광도 254 nm에서 60 분간 측정하였다. 각 구성당의 mole%는 유도체화된 internal standard(glucosamine 사용) 대비 시료의 peak 면적과 각 단위의 분자량으로부터 환산하여 계산하였다.

3. RAW 264.7 cell에 대한 NO 및 cytokine 생성능

대표적인 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포를 회수하여 nitric oxide(NO)와 IL-6 및 TNF-α를 측정하기 위해 96 well plate에 2.0×10^5 cells/well로 세포수를 조정하여 100 µL씩 가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 세포를 부착시켰다. 이후 0.06~1,000 µg/mL까지 다양한 농도로 희석하여 시료를 100 µL씩 첨가하였고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다(Janeway CA 1968). 배양 종료 후 원심분리(900 rpm, 5 min, 4°C)하여 세포배양액을 50 µL 회수하여 상등액에 유도된 NO를 Griess reagent system kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다. 반면, IL-6의 경우에는 상등액을 2배, TNF-α의 경우에는 5배를 희석한 후, Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(Mouse IL-6 ELISA, BD Biosciences, San Jose, USA; Mouse TNF-α kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cytokine의 생성량을 측정하였다.

4. qPCR을 통한 유전자 발현도 측정

Chemokine과 cytokine의 생산에 관련된 mRNA expression을 확인하기 위해 먼저 RAW 264.7 세포를 60 π dish에 1.5×10^6 cells/dish로 조정된 후 37°C, CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 이후, 시료를 DMEM에 용해하여 최종농도가 0.5 µg/mL에서 100 µg/mL이 되도록 처리하고, 37°C, CO₂ 배양기에서 3시간 배양하였다. 이후, 제조사의 지침에 따라 RNeasy Mini Kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 RNA를 추출하고 nanodrop을 이용하여 정량한 후, ReverseAid First Strand cDNA Synthesis kit(Fermentas, MA, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 cDNA를 합성하였으며, 합성된

cDNA는 냉동보관하여 사용하였다. iNOS, IL-6 및 TNF- α 의 DNA 발현량을 측정하기 위해서 power SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용, quantitative real-time PCR(qPCR)을 수행하였다. 이때 사용된 각 primer의 서열은 다음과 같다. β -actin; 5'-ACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'(sense), 5'-CTGGATGG CTACGTACATGG-3'(anti-sense), iNOS; 5'-ACATCGACC CGTCCACAGTAT-3'(sense), 5'-CAGAGGGGTAGGCTT GTCTC-3'(anti-sense), IL-6; 5'-ACAAAGCCAGAGTCCTT CAGAG-3'(sense), 5'-GTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'(anti-sense), TNF- α ; 5'-GTACCTTGTCTACTCCCAGGTT CT-3'(sense), 5'-TGGAAGACTCCTCCCAGGTATATG-3'(anti-sense). 이후 상대적인 유전자 발현량(relative mRNA expression)은 Step One Plus System(Applied Biosystems)을 이용하여 확인하였다. qPCR 조건은 IL-6와 TNF- α 의 경우, 95°C에서 15초→60°C에서 1분으로 40 cycles(melting curve), iNOS의 경우 95°C에서 15초→58°C에서 20초→72°C에서 30초로 40 cycles (melting curve) 증폭시켜 시료의 comparative C_T값을 구한 후, house keeping gene β -actin 유전자 cDNA를 같은 방법으로 증폭하여 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 방법으로 정량하였다.

5. Western blotting

대식세포 내 대표적인 신호전달 경로인 mitogen-activated protein kinase(MAPK)와 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- κ B) 경로를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 60 π dish에 1.0 \times 10⁶ cells/dish로 조정 후 37°C, CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 이후, 시료를 DMEM에 용해하여 최종농도가 1 μ g/mL에서 100 μ g/mL이 되도록 처리한 후, 37°C, CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다. 배양 후 남아있는 배지를 완전히 제거한 뒤 TBS로 세척하고 Ripa buffer 400 μ L로 세포를 lysis시키기 위해 ice 상에 방치하였다. 이후, dish를 ice 상에서 30분 방치하여 세포 용출액을 회수하였다. 용출된 단백질은 원심분리(13,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 상등액과 Laemmli sample buffer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 3:1 비율로 혼합한 후 100°C에서 5분간 증탕한 후, 상온에 보관하면서 추후 Western blotting 실험을 위한 시료로 사용하였다.

Western blotting을 진행하기 위해 10% polyacrylamide gel에 제조된 시료를 20 μ L loading하여 120 V에서 90분간 전기영동하였다. 전기영동이 완료된 gel은 PVDF membrane(Millipore, Billerica, MA, USA)에 0.45 A에서 80분간 transfer 하고, PVDF membrane을 5% skim milk(Sigma-Aldrich) 및 5% BSA(Bovine serum albumin)(Sigma-Aldrich)를 이용하여 2시간 blocking 하였다. 그 후, 1% TBS-T(Tris 247 mM,

NaCl 1,370 mM, KCl 27 mM, Tween 20 0.5%, pH 7.6)를 이용하여 10분간 2회 세척하였다. 이후 1차 항체를 각각의 비율로 희석하여 처리하였고, 4°C에서 12시간 반응시킨 후, 1% TBS-T를 이용하여 10분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항체를 각각의 비율로 희석하여 처리하고 2시간 반응시킨 후, 1% TBS-T를 이용하여 10분간 3회 세척하였다. 항체반응이 완료된 membrane은 ECL(Enhanced chemiluminescence, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)과 반응시켜 X-ray film(Agfa, Mortsel, Belgium)에 현상시켜 확인하고자 하는 단백질의 발현양을 비교하였다.

6. Confocal을 이용한 NF- κ B 경로의 확인

대식세포 내 또다른 대표적 신호전달 경로인 NF- κ B의 핵 내로의 신호전달 이행 여부를 현미경으로 관찰하고자 confocal을 이용하여 실험을 진행하였다. 24 well plate에 12 mm cover slip(Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Germany)을 넣고 0.1% gelatin(Sigma-Aldrich) 500 μ L씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 방치한 뒤, 상등액을 모두 제거하였다. 여기에 2.0 \times 10⁵ cells/mL로 조정된 RAW 264.7 세포를 37°C, CO₂ 배양기에서 5시간 동안 세포를 부착시킨 후, 시료를 최종농도가 100 μ g/mL가 되도록 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 시료를 처리하였다. 시료처리 종료 후 PBS로 1회 washing하고 4% formaline(pH 7.2) 500 μ L씩 가하여 15분간 실온 방치함으로써 신호전달 반응을 중지하였다. 이후 PBS로 3회 washing(500 μ L, 5 min)하고 5% BSA(in 0.1% Trion X-100/1 \times PBS)를 300 μ L씩 처리하여 25°C의 암실에서 1시간 반응시켰다. 반응 종료 후 PBS로 2회 washing(500 μ L, 5 min)하고 1차 항체(p65)(Santa cruz)를 1% BSA(in 0.3% Triton X-100/1 \times PBS)에 1:200으로 희석한 뒤 250 μ L씩 처리하여 4°C에서 12시간 반응시켰다. 이후 PBS를 이용하여 washing(500 μ L, 5 min, 3회)하고 2차 항체(Alexa Flour 488 goat anti-rabbit IgG)(Thermo Fisher Scientific, Seoul, Korea)를 1% BSA(in 0.3% Triton X-100/1 \times PBS)에 1:2,000으로 희석한 뒤 250 μ L씩 처리하여 25°C의 암실에서 70분간 반응하였다. 이후 PBS로 3회 washing(500 μ L, 5 min)하고 24 well로부터 cover slip을 분리하여 mounting medium with DAPI(Vectashield, Burlingame, USA)와 함께 slide glass에 처리한 뒤 Confocal laser scanning microscopy(Carl Zeiss Microscopy, NY, US)를 이용하여 cell morphology를 관찰하였다.

7. 대식세포의 pattern recognition receptors (PRRs)

RAW 264.7 세포를 이용하여 대식세포 표면에 존재하는 수용체의 발현유무를 확인하기 위해 2.0 \times 10⁶ cells/mL로 조

정된 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 100 μ L씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5시간 배양한 뒤, TLR-2, TLR-4, SR, CD14, MR, CR3, Dectin-1 수용체(pattern recognition receptor antibodies, anti-PRRs)를 최종농도가 각각 10 μ g/mL이 되게 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 방치하였다. 이후 DMEM에 시료를 용해 및 희석하여 최종 농도가 100 μ g/mL이 되도록 처리하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 시료를 처리하였다. 시료처리 종료 후, NO는 Griess reagent system kit(Promega)를 이용하였고, IL-6는 Mouse IL-6 ELISA kit(BD Biosciences)를, TNF- α 는 Mouse TNF- α kit(Invitrogen)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 함량을 측정하였다.

8. 통계처리

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, SPSS 통계프로그램을 이용하여 Duncan multiple test로 대조군과 각 시험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 진피로부터 분리한 다당의 구성당 분석

진피로부터 열수추출하여 얻은 조다당 CPP의 구성당 분석을 진행한 결과, mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose, arabinose 총 6종의 단당이 검출되었다. 이는 펙틴을 구성하는 물질 중 가장 많은 부분을 차지하는 HG 영역의 구성성분인 galacturonic acid가 67.6%로 가장 많이 차지하고 있었으며, RG-I 및 RG-II의 구성성분인 arabinose, galactose, glucose, rhamnose가 각각 19.0%, 7.8%, 3.1%, 1.6%로 이루어져 있는 것으로 보아 아마도 진피에 존재하는 다량의 pectin 물질이 검출된 것이라 확인하였다(Mohnen D 2008).

2. 진피 유래 조다당의 NO 및 cytokine 생성능

선천면역계에는 대식세포(macrophage), 자연살해세포(Natural killer cell, NK cell), 수지상세포(dendritic cell)와 같은 면역세포가 존재한다. 특히 대식세포는 어떤 인자에 의해 활성화가 되면 외부로부터 침입한 세균, 바이러스 및 이물질을 제거하기 위해 다양한 chemokine이나 cytokine을 분비하면서 자기 방어를 하게 된다(MacMicking 등 1997; Forman & Torres 2002). Chemokine류 중에 하나인 nitric oxide(NO)는 반응성이 높은 염증성 free radical로써 면역반응에서 중요한 세포신호전달 분자로서 미생물을 제거하는데 관여한다. NO는 NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 세포 내의 L-arginine으로부터 생성되며, 혈관 기능을 조절하는

endothelial NOS(eNOS), 혈압 조절 및 혈관 확장과 관련된 neuronal NOS(nNOS) 및 병원체에 대해 면역방어를 나타내는 inducible NOS(iNOS) 3가지가 있다고 알려져 있다(Stuehr DJ 1999). 특히 iNOS에 의해 생산되는 NO는 외부에서 침입한 병원체로부터 인체를 방어하며, 순환계 질환, 염증 질환 및 암을 예방한다고 보고되어 있다(Kröncke 등 1998). 반면, 대식세포가 활성화되면 chemokine 뿐만 아니라 다양한 cytokine이 분비되는데(Sung 등 2016) 이는 면역세포들의 신호전달 및 다양한 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 면역세포 사이에 복잡한 신호전달을 통해 전반적인 면역계의 반응 및 효율화에 기여한다고 알려져 있다(Starr 등 1997). 따라서, 본 연구진은 먼저 진피 유래 조다당 CPP의 직접적인 세포독성을 확인하기 위해 Raw264.7 세포에 CPP 시료를 0.06~1,000 μ g/mL의 다양한 농도로 처리하여 세포독성을 관찰한 결과, 세포독성은 나타나지 않았으며 오히려 3.9 μ g/mL 이상의 농도에서는 세포 증식능을 보여주었다. 또한, 대식세포 유래 세포주인 RAW 264.7 세포의 NO 및 면역조절에 관련된 대표적인 cytokine IL-6 및 TNF- α 의 생성능을 확인한 결과(Fig. 1), NO의 경우 3.9 μ g/mL 농도부터 양성대조군 대비 50% 이상의 우수한 NO 생산능을 보여주었으며, IL-6 및 TNF- α 의 경우에는 62.5 μ g/mL 이상에서 양성대조군 대비 90% 이상의 우수한 cytokine 분비능을 보여주었다. IL-6는 인체내 감염 및 조직 손상으로 인해 면역 초기반응에 분비되는 주요 반응 매개 단백질로써, 염증 반응을 촉진하거나 억제하는 것으로 알려져 있고, TNF- α 는 종양 피사를 유발하거나 미생물에 의한 감염 저항성을 향상시킨다고 알려져 있다. 진피 유래 조다당 CCP는 NO, IL-6 및 TNF- α 와 같은 chemokine 및 cytokine 분비능을 증가시켜 선천면역계의 대표적 면역세포인 대식세포를 활성화시켜 면역증강 효과에 관여함을 확인하였다.

3. 진피 유래 조다당의 mRNA gene expression

앞선 cytokine 분비능 결과에서 진피 유래 조다당 CPP는 우수한 NO 및 cytokine 생산능을 보여주었다. 이를 바탕으로 CPP의 면역조절 관련 유전자 IL-6, TNF- α 및 iNOS mRNA expression을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 이용, quantitative real-time PCR(qPCR)로 분석하였다. 그 결과(Fig. 2), 진피 유래 조다당 CPP는 iNOS와 IL-6의 mRNA 발현량이 50 및 100 μ g/mL 처리에서 우수한 발현량을 나타내었으며, TNF- α 의 mRNA 경우, 농도의존적인 활성을 보여주었으며, 100 μ g/mL 농도에서는 양성대조군 대비 약 90% 이상의 발현량을 보여 주었다. 이를 통해 진피 유래 조다당 CPP는 IL-6, TNF- α 및 iNOS 유전자를 발현시켜 최종적으

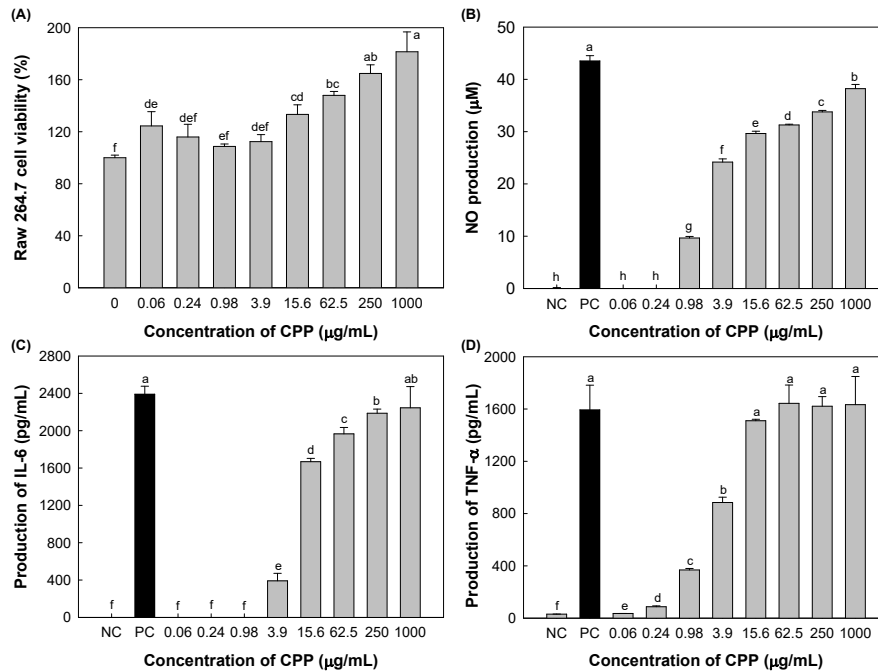


Fig. 1. Effects of CPP on cell viability (A), NO (B), IL-6 (C) and TNF- α (D) production in RAW 264.7 cells. NC (medium) and PC (LPS, 1 μ g/mL) were used as negative and positive control. Bars with lower case letters (^{a-h}) indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

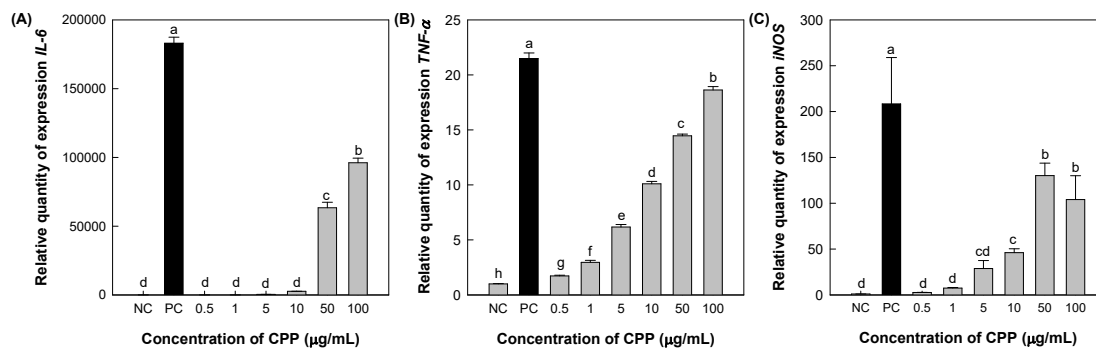


Fig. 2. Effects of CPP on mRNA expression of IL-6 (A), TNF- α (B) and iNOS (C) in RAW 264.7 cells by real time PCR. NC (medium) and PC (LPS, 1 μ g/mL) were used as negative and positive control. Bars with lower case letters (^{a-h}) indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

로 NO, IL-6 및 TNF- α 와 같은 chemokine 및 cytokine 생산을 유도할 것으로 사료되었다. 이는 염증부위에 면역세포들이 모여들거나 염증 반응을 억제하는 NO 및 IL-6와 종양괴사 유발 및 미생물 감염 저항성 향상과 관련이 있는 TNF- α 를 유의적으로 생산함으로써 생체방어에 작용하는 선천면역기구의 활성화 및 조절에 관여하여 면역증강효과를 나타낸다는 것을 재차 확인하는 결과였다.

4. 진피 유래 조다당의 중화항체를 이용한 대식세포의 수용체 경로 확인

대식세포 막 표면에는 TLR-2, TLR-4, MR, CR3, SR, CD14 및 Dectin-1 등의 pattern recognition receptors (PRRs) 수용체가 발현되어 있어 lipopolysaccharide (LPS) 혹은 β -glucan과 같은 천연물 유래 다당 분자가 세포내 신호전달을 유도한 후 핵 내로 들어가 transcription factor를 활성화시켜 최종적으로 다양한 cytokine 및 chemokine의 생산을 유도한

다고 알려져 있다(Lewis 등 1998; Rice 등 2002; Taylor 등 2002; Yang 등 2003).

진피 유래 조다당 CPP가 대식세포 막 표면에 존재하는 수용체 중 어떤 수용체와 결합하여 세포 내로 들어가 활성화하여 NO 및 IL-6, TNF- α 를 생성하는지를 먼저 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 TLR-2, TLR-4, MR, CR3, SR, CD14 및 Dectin-1 receptors-blocking antibodies를 처리하여 상대적인 NO 및 IL-6, TNF- α 분비량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 3), NO의 경우, TLR2, TLR4 및 Dectin-1 중화항체를 처리한 군에서 활성이 급격히 감소되는 것으로 보아 대식세포가 활성화되어 NO를 생산하기 위해서는 TLR2, TLR4 및 Dectin-1에 CPP가 결합하여 세포 내로 들어간다는 것을 확인하였다(Fig. 3(A)). 반면, IL-6 및 TNF- α 의 경우, MR 중화항체를 처리한 군에서 생성능이 가장 크게 감소한 것으로 보아 대식세포가 활성화되어 IL-6 및 TNF- α 를 생산하기 위해서는 MR에 CPP가 결합하여 세포 내로 들어간다는 것을 확인하였다 (Fig. 3(B), (C)). 따라서 진피 유래 조다당 CPP는 대식세포 표면에 존재하는 TLR2, TLR4 및 Dectin-1과 결합하여 NO를 분비하며, MR과 결합하여 IL-6 및 TNF- α 와 같은 cytokine을 분비하는 것으로 확인되었다. 나아가 대식세포 내 신호전달 경로를 확인하고자 하였다.

5. 진피 유래 조다당의 대식세포 내 MAPK 및 NF- κ B 경로의 활성화

앞에서도 언급하였듯이 대식세포 막 표면 존재하는 수용체에 lipopolysaccharide(LPS) 혹은 β -glucan과 같은 천연물 유래 다당 분자가 결합하면 일련의 연속된 세포 내 MAPK 및 NF- κ B 경로와 같은 신호전달을 유도한 후(Rice 등 2002; Taylor 등 2002) 핵 내로 들어가 다양한 transcription factor를 활성화시켜 최종적으로 cytokine 및 NO 등의 생산을 유도하게 된다(Lewis 등 1998; Yang 등 2003). 특히, NF- κ B의 subunit 중 하나인 p65는 세포질 내에 존재하는 비인산화된 형태의 I κ B α 에 의해 억제된 상태로 존재하고 있는데 ligand

자극에 의해 I κ B α 를 인산화시켜 분해되면, p65는 핵 내로 이동하여 유전자들의 전사를 개시함으로써 다양한 cytokine의 생산을 유도한다(Liacini 등 2002).

진피 유래 조다당 CPP의 대식세포 내 신호전달 경로를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 CPP 시료를 1~100 μ g/mL의 농도로 처리하여 신호전달과 관련된 단백질 수준을 관찰한 결과(Fig. 4), MAPK(p38, ERK) 단백질이 농도의존적으로 인산화된 것을 확인하였으며, 50과 100 μ g/mL의 농도에서는 큰 차이를 나타내지 않았으며, p38, ERK 단백질의 전체량에는 큰 변화가 없었다. 한편 NF- κ B 신호전달 경로에서 p65가 활성화되면 I κ B α 가 분해되면서 p65가 핵 내로 들어간다고 알려져 있는데 진피 유래 조다당 CPP를 1~100 μ g/mL의 농도로 RAW 264.7 세포에 처리한 결과, 농도 의존적으로 I κ B α 의 분해를 유도하는 것을 확인하였다. 또한, p65가 인산화되어 핵 내로 이동하여 transcription factor로 작용하는지를 현미경으로 관찰하기 위해 confocal microscopy를 이용하여 확인하였다. 그 결과(Fig. 5), 시료를 처리하지 않은 군에서는 세포질에서만 FITC 형광(초록색)이 발색되는 반면, 양성대조군 LPS의 경우 p65가 활성화되어 핵 내로 들어가 FITC 형광이 핵 안에서도 나타나는 것을 확인하였으며, 이와 마찬가지로 CPP 100 μ g/mL의 농도로 처리한 결과에서도 양성대조군과 거의 유사하게 p65가 활성화되어 핵 내로 들어가 FITC 형광이 핵 안에서도 나타나는 것을 확인하였다. 위의 결과를 종합해 볼 때 진피 유래 조다당 CPP는 선천면역계의 대표적인 면역세포인 대식세포를 활성화시키기 위해 MAPK(p38, ERK) 및 NF- κ B 경로를 거쳐 핵 내로 들어가 transcription factor p65를 활성화시켜 *iNOS*, *IL-6* 및 *TNF- α* 의 유전자 발현을 촉진시키고 관련 cytokine 및 NO의 생산을 유도하여 나아가 면역증진 활성화에 공헌한다는 것을 확인하였다. 따라서 대식세포의 수용체 경로 및 신호전달 경로 결과를 모두 종합해 보면 진피 유래 조다당 CPP는 대식세포를 활성화시켜 NO, IL-6 및 TNF- α 와 같은 다양한 면역활성 물질을 분비하는데, 특히 chemokine인 NO는 대식세

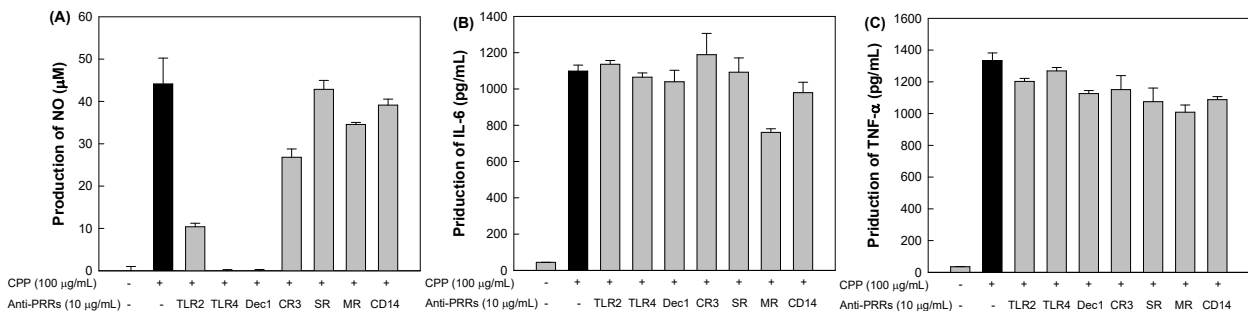


Fig. 3. Effects of CPP on treatment anti-PRR antibodies on NO (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) production in RAW 264.7 cells.

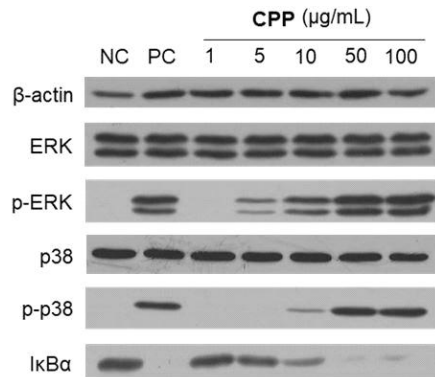


Fig. 4. Phosphorylation of MAPK and NF- κ B pathways by treatment of CPP on RAW 264.7 cells. NC (medium) and PC (LPS, 1 μ g/mL) were used as negative and positive control.

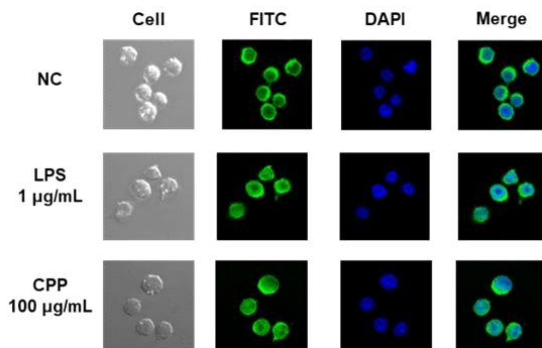


Fig. 5. Effects of CPP on the translocation of activated p65 in RAW 264.7 cells.

포 막 표면에 존재하는 TLR2, TLR4 및 Dectin-1 수용체와 결합하여, cytokine IL-6와 TNF- α 는 MR 수용체와 결합하여 p38, ERK 및 NF- κ B 경로를 인산화시킴으로써 연속적인 신호전달 후 핵 내로 들어가 transcription factor p65를 활성화시켜 NO, IL-6 및 TNF- α 를 생산한다고 최종 결론지었다.

요약 및 결론

본 연구에서는 진피로부터 분리한 다당의 대식세포에 대한 면역증진 효과를 관찰하기 위하여 RAW264.7 세포주를 이용하여 실험을 진행하였다. 건조된 진피로부터 열수추출 및 에탄올 침전을 통해 조다당 CPP를 얻었다. 대식세포주 RAW264.7 cell을 이용하여 면역증진 효과를 확인하고자, 세포독성을 측정하고 결과 세포에 직접적인 독성을 나타내지 않았으며 오히려 증식능을 보여주었다. 면역증진과 관련된 NO, IL-6 및 TNF- α 를 ELISA를 통해 측정하고 결과 농도 의존적으로 우수한 cytokine 분비능을 보여주었다. mRNA

expression 결과에서도 우수한 *iNOS*, *IL-6* 및 *TNF- α* 발현량을 나타내었다. 다음, 대식세포 막 표면에 존재하는 수용체와 세포내 신호전달 경로를 확인하고자, western blotting과 confocal을 이용하여 관찰한 결과, NO는 TLR2, TLR4 및 Dectin-1 수용체와 결합하여, IL-6와 TNF- α 는 MR 수용체와 결합하여 p38, ERK 및 NF- κ B 경로를 인산화시킴으로써 연속적인 신호전달을 거쳐 핵 내로 이행되어 p65를 활성화시켜 NO, IL-6 및 TNF- α 를 생산한다고 최종 결론지었다. 이는 식품 소재 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

감사의 글

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. NRF-2019R1C1C1006496).

References

- Deng C, Fu H, Shang J, Chen J, Xu X. 2018. Dectin-1 mediates the immunoenhancement effect of the polysaccharide from *Dictyophora indusiata*. *Int J Biol Macromol* 109:369-374
- Doco T, Williams P, Pauly M, O'Neill MA, Pellerin P. 2003. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr Polym* 53:253-261
- Forman HJ, Torres M. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166:S4-S8
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. 2009. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal β -glucans and Toll-like receptor agonists. *Infect Immun* 77:1774-1781
- Iwasaki A, Medzhitov R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291-295
- Janeway CA. 1968. Progress in immunology: Syndromes of diminished resistance to infection. *J Pediatr* 72:885-903
- Kačuráková M, Wilson RH. 2001. Developments in mid-

- infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydr Polym* 44:291-303
- Kandaswami C, Middleton E Jr. 1994. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In Armstrong D (Ed.), *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. pp.351-376. Springer
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384
- Kim HN, Ko SB, Kim BS. 2021. Economic impacts of the increase in green immature citrus demand on Jeju field citrus industry. *J Korea Acad Ind Coop Soc* 22:108-114
- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113:147-156
- Kwak BS, Park HR, Lee SJ, Choi HJ, Shin KS. 2017. Chemical properties and assessment of immunomodulatory activities of extracts isolated from broccoli. *Korean J Food Nutr* 30:1140-1148
- Lee EH, Park HR, Shin MS, Cho SY, Choi HJ, Shin KS. 2014. Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean *Citrus* Hallabong. *Carbohydr Polym* 111:72-79
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139
- Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. 2002. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 21:251-262
- MacMicking J, Xie Q, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350
- Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11:266-277
- Montanari A, Chen J, Widmer W. 1998. Citrus flavonoids: A review of past biological activity against disease. In Manthey JA, Buslig BS (Eds.), *Flavonoids in the Living System*. pp.103-116. Springer
- Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL. 2002. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans. *J Leukocyte Biol* 72:140-146
- Schepetkin IA, Quinn MT. 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 6:317-333
- Shin MS, Lee H, Hong HD, Shin KS. 2016. Characterization of immunostimulatory pectic polysaccharide isolated from leaves of *Diospyros kaki* Thunb. (persimmon). *J Funct Foods* 26:319-329
- Shin MS, Park SB, Shin KS. 2018. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity by polysaccharide isolated from the peels of *Citrus unshiu*. *Int J Biol Macromol* 112:576-583
- Sung NY, Park YY, Kim YE, Cho EJ, Kim MH, Ryu GH, Byun EH, Park YJ. 2016. Immuno-modulatory activities of polysaccharides separated from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* in macrophage cells. *Korean J Food Nutr* 29:431-437
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJL, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-921
- Stuehr DJ. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411:217-230
- Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SYC. 2002. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169:3876-3882
- Wang DD, Pan WJ, Mehmood S, Cheng XD, Chen Y. 2018. Polysaccharide isolated from *Sarcodon aspratus* induces RAW264.7 activity via TLR4-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Int J Biol Macromol* 120:1039-1047
- Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. 2003. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320:3-21
- Yapo BM, Lerouge P, Thibault JF, Ralet MC. 2007. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydr Polym* 69:426-435

Received 26 July, 2021

Revised 23 August, 2021

Accepted 06 September, 2021