



The immune enhancement effect of *Nelumbo nucifera Gaertner* Seed Extract (NSE) in murine macrophage RAW 264.7 cells

Se Jeong Kim¹ · San Kim¹ · Se Hyeon Jang¹ · Sung Ran Yoon² ·
Bo Ram So² · Jeong Min Park² · Jung A Ryu² · Sung Keun Jung¹

RAW 264.7 대식세포에서 연자육 추출물(*Nelumbo nucifera Gaertner* Seed Extract, NSE)의 면역 증강 효과

김세정¹ · 김 산¹ · 장세현¹ · 윤성란² · 소보람² · 박정민² · 류정아² · 정성근¹

Received: 6 December 2022 / Accepted: 19 January 2023 / Published Online: 9 February 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Since the global shock caused by COVID-19, interest in immune-enhancing materials is rapidly increasing, therefore, the development of novel materials is necessary from the industrial and health perspectives. In this study, we selected *Nelumbo nucifera Gaertner* Seed Extract (NSE) and evaluated immune enhancement effect by using RAW 264.7 murine macrophage cells. NSE significantly up-regulated production of nitric oxide and reactive oxygen species without affecting cell viability in RAW 264.7 cells. Additionally, NSE exhibited an increase of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells. The enzyme-linked immunosorbent assay results showed that NSE-treatment significantly enhanced production of interleukin 6 and tumor necrosis factor- α in RAW 264.7 cells. Furthermore, we observed that NSE significantly up-regulated phosphorylation of p65, I kappa B kinase α/β , and I kappa B (IkB) α as well as down-regulation of

IkB α expression in RAW 264.7 cells. Our findings indicate that NSE could be the potential health-functional food material with capacity of improving immunity via Nuclear factor-kappa B signaling pathway.

Keywords Cytokines · Health functional food · Improving immunity · Innate immunity · Nitric oxide · Nuclear factor-kappa B · Reactive oxygen species

서 론

COVID-19 팬데믹(Pandemic)으로 인한 전세계 사망자는 약 600만 명에 이르며, 확진 이력이 있는 사람들은 다양한 만성질환이 발병 등으로 심각한 고통을 겪고 있다[1]. 이러한 사회적 배경에서 건강기능 섭취를 통해 바이러스, 병원성 미생물 등의 병원체에 대한 인간의 방어 체계 중 하나인 면역력 향상에 대한 사람들의 관심이 증가하고 있다[2]. 다양한 연구진이 면역력 증진을 위한 신소재 개발 연구를 진행하고 있지만[3], 면역기능 증진 건강기능식품 소재 개발에 대한 연구는 여전히 필요한 실정이다.

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)는 p65와 p50의 이량체로써 거의 모든 동물세포에서 발견되며 스트레스, 중금속(heavy metal), 자외선(ultraviolet)에 자극에 반응하며, 특히, 감염에 의한 면역조절에 중추적인 역할을 한다[4-6]. 정상상태에서 NF- κ B는 I kappa B (IkB)와 결합되어 불활성화된 상태로 세포질에 존재한다. 하지만, 외부자극인자에 의해 활성화된 IkB kinase

Sung Keun Jung (✉)
E-mail: skjung04@knu.ac.kr

¹School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu, Republic of Korea

²Division of Agricultural Environment Research, Gyeongsangbuk-do Agricultural Research & Extension services, Daegu, Republic of Korea

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.

(IKK)가 I κ B를 인산화하면, I κ B는 ubiquitination 과정으로 분해되고, 핵으로 이동하여 특정 DNA 서열에 결합하여 타깃유전자의 전사를 개시한다. 면역 세포의 활성화를 수행하는 interleukin 6 (IL-6)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 포함한 사이토카인은 NF- κ B의 대표적인 타깃 유전자 중 하나이다. 또한, 다양한 감염원으로부터 인체를 보호하는 방어작용을 수행하는 nitric oxide (NO)와 reactive oxygen species (ROS)의 생성에도 관여한다[7].

연자육(*Nelumbo nucifera Gaertner seed*, NS)은 연꽃과(Nelumbonaceae)에 속하는 연꽃의 성숙한 씨앗이다. 연자육은 각종 질병의 예방과 개선에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 폴리페놀, 단백질, 다당류 등이 풍부하게 함유되어 있다[8-10]. 이러한 성분 중에서 nuciferine, pronuciferine, isoliensinine 및 neferine 과 같은 bisbenzylisoquinoline alkaloids가 주요 화합물이며, 고혈압 예방, 당뇨병 예방, 피로회복 및 혈관 건강 개선 등 다양한 약리학적 특성을 가지고 있다고 보고 되고 있다[11]. 하지만, 연자육이 면역증진 효능과 NF- κ B 활성화에 미치는 영향에 대한 구체적인 연구결과는 보고 된 바 없다.

본 연구에서, 연자육 추출물(*Nelumbo nucifera Gaertner seed extract*, NSE)이 IKK와 I κ B의 인산화를 증가시키고 p65의 활성을 촉진하여 NO, ROS 및 IL-6와 TNF- α 의 생산을 증가시킬 수 있는 잠재적 면역 강화 건강기능식품 소재가 될 수 있음을 나타내었다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM), 항생제(penicillin/streptomycin solution), 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Thermo Scientific HyClone (Logan, UT, USA)으로부터 구입하였다. Western blot 실험에 사용하기 위한 β -actin 1차 항체는 Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, inducible nitric oxide synthase (iNOS), I κ B kinase α (IKK α), phospho-IKK α/β (Ser176/180), NF- κ B p65, phospho-NF- κ B p65 (Ser536), I κ B α , phospho-I κ B- α (Ser32) 1차 항체는 Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Peroxidase가 결합된 Pierce Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L), Pierce Goat Anti-Mouse IgG, (H+L) 2차 항체는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다.

시료 준비 및 추출

연자육은 경상북도에서 생산 및 판매하는 분말을 연의허루(Gumi, Korea)에서 구입하여 원료로 사용하였다. 연자육 분말과 3차 증류수, 50% 주정을 1:30의 비율로 각각 혼합한 후 항온수조(VS-1205SW1, Shaking water bath, Vision scientific, Bucheon, Korea)에서 80°C, 4시간 추출한 후 8,000 rpm 30분간 원심분리(CR22N, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Tokyo, Japan) 하였다. 원심분리한 상등액을 40°C에서 농축(RKTS-22060-SNN, Genevac Ltd. Philadelphia, PA, USA)한 후 동결건조(FDU-7024, Operon co. Gimpo, Korea)하여 시료로 사용하였다. 증류수와 50% 주정 추출물의 수율은 각각 33.00, 21.06%였다.

세포 배양

RAW 264.7 대식세포는 한국세포주은행(KCLRF, Korean Cell Line Research Foundation, Seoul, Korea)에서 구입하여 10% FBS와 1% 항생제(100 U/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin)를 함유한 DMEM를 이용해 배양하였다. 세포는 37°C의 온도 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 독성 평가

NSE에 대한 RAW 264.7 대식세포의 독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실행하였다. RAW 264.7 대식세포를 3 \times 10⁵ cells/mL 농도로 96 well plate에 100 μ L 분주하여 37°C의 온도 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 세포에 NSE를 농도별(50, 100 μ g/mL)로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 5 mg/mL의 Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide (MTT) 시약(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 96 well plate에 10 μ L 분주하여 4시간 배양하였다. 4시간 배양한 96 well plate의 상층액 80 μ L를 제거하고 생성된 formazan crystal을 Dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich)를 100 μ L 분주하여, 96 well plate를 은박지에 감싸 15분, 100 rpm으로 shaking 하여 녹여주었다. microplate reader (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) 를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[12].

Nitric Oxide 측정

Nitrite (NO₂⁻)의 생산은 Griess 시약과의 비색분석을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포 3 \times 10⁵ cells/mL 농도로 96 well plate에 100 μ L 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 24시간 배양한 세포에 NSE를 농도별(50, 100 μ g/mL)로 처리한 후 24시간 배양하였다. 각 군별 세포 상층액 100 μ L와 동량의 Griess 시약(0.2% N-(1-naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride (NED)과 5% phosphoric acid 속 1% sulfanilamide)을 가하고, 15분 배양 후 microplate reader기(Bio-Rad Inc.)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 농도별로 용해하여 NO의 표준곡선으로 사용하였다[12].

ROS 생성 평가

RAW 264.7 대식세포에서 ROS의 생성을 측정하기 위해 DCFH-DA assay를 이용하였다. RAW 264.7 대식세포 2 \times 10⁵ cells/mL 농도로 96 well plate에 200 μ L 분주하고 37°C의 온도 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 세포에 NSE를 농도별(50, 100 μ g/mL)로 처리한 후 24시간 배양하였다. PBS로 1번 세척한 후, 빛을 차단한 상태에서 DCFH-DA를 Serum free media에 20 μ M로 희석하여 200 μ L 분주하고 30분간 반응시켰다. PBS로 2번 세척한 후, microplate fluorometer (Molecular Device, San Jose, CA, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다[13,14].

사이토카인 생성 평가

RAW 264.7 대식세포에서 사이토카인(IL-6, TNF- α)의 생성을 측정하기 위해 sandwich ELISA assay를 이용하였다. RAW 264.7 대식세포 3 \times 10⁵ cells/mL 농도로 48 well plate에 500 μ L 분주하고 37°C의 온도 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양

하였다. 24시간 배양한 세포에 NSE를 농도별(50, 100 µg/mL)로 처리한 후 24시간 배양하였다. Coating buffer에 capture antibody를 희석하여 plate에 100 µL 분주하고 4 °C의 온도에서 하룻밤 동안 부착시켰다. Plate에 PBS-Tween 20 (0.05%) 200 µL 분주하여 씻어준 후 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)/ELISPOT Diluent을 200 µL 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 씻어준 후 제조한 표준용액과 배양액을 100 µL 분주하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 씻어준 후 detection antibody를 100 µL 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 씻어준 후 streptavidin-HRP를 100 µL 분주하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 씻어준 후 Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate solution을 100 µL 분주하여 15분 동안 반응시키고, stop solution을 100 µL 첨가하여 반응을 중단시켰다. microplate reader기(Bio-Rad Inc.)를 사용하여 450와 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[15].

Western blot 분석

Western blot 분석을 위해 RAW 264.7 대식세포를 3×10⁵ cells/mL 농도로 6 well plate에 3 mL 분주하고 37 °C의 온도 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 cell에 NSE를 농도별(50, 100 µg/mL)로 처리하였다. 반응 시간이 지나면 plate를 얼음 위에 두고 차가운 PBS로 2번 씻어 준 후, cell lysis buffer (Cell signaling Technologies)로 용해 하였다. Lysis buffer를 cell scraper로 회수하여 1.5 mL tube에 옮긴 후, 얼음에서 10분에 1번씩 총 3번 vortexing 하였다. 원심분리기에 4 °C에서 15분간 12,000 rpm 조건으로 원심분리 하여 상층액을 얻은 후, 단백질 농도는 DC Protein Assay Kit reader (Bio-Rad Inc.)를 사용하여 측정하였다.

10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 단백질 혼합액을 loading하여 전기 영동을 통해 단백질을 분리한 후 polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Immobilon®-P transfer membrane, Burlington, MA, USA)에 transfer하였다. 5%의 skim milk로 상온에서 1시간 blocking한 후 각각의 1차 항체를 4 °C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 membrane을 TBST (tris-buffered saline Tween-20)를 바꿔가며 5분마다 1번 씩 총 3번 씻어주고, skim milk에 1:5000으로 희석한 2차 항체를 실온에서 1시간 반응시켰다. Membrane 세척 후 EzWestLumi plus를 처리해 단백질 발현 및 인산화 정도를 측정하였다. 단백질 band는 chemiluminescence detection kit (ATTO, Tokyo, Japan)과 GeneGnome XRQ NPC (Syngene, Cambridge, UK)을 각각 이용해 정량 및 시각화 하였다 [14].

통계 분석

모든 실험 결과는 평균(mean)±표준편차(Mean± standard deviation)로 표시하였으며, 통계분석은 GraphPad Prism 9 software (Graph Pad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행되었다. 대조군과 NSE 실험군의 비교는 one-way ANOVA (analysis of variance)로 분석하였고, 통계적 유의성에 대한 기준으로 대조군과 비교하여 p<0.05일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

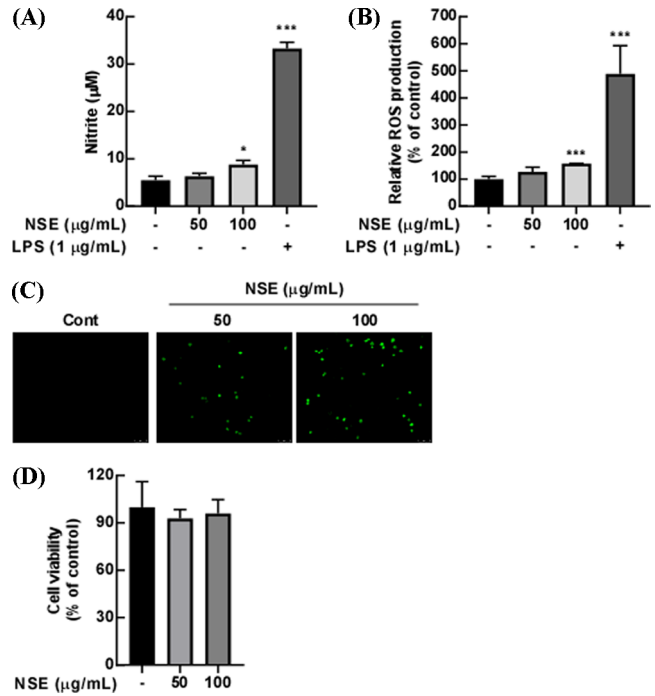


Fig. 1 The effects of NSE on NO and ROS production in RAW 264.7 cells. The RAW 264.7 cells were treated with NSE at 50, 100 µg/mL for 24 h. (A) NSE increased nitrite (NO) production in RAW 264.7 cells. Nitrite production was measured by using Griess reagent. (B, C) NSE increased reactive oxygen species (ROS) production in RAW 264.7 cells. ROS production was measured by using DCF-DA staining. Scale bar=50 µm. (D) NSE was not shown cytotoxicity in RAW 264.7 cells. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments. *p < 0.05 and ***p < 0.001 represent a significant difference compared with the control group

결과 및 고찰

RAW 264.7 대식세포에서 NO와 ROS 생산에 대한 NSE의 효과

NO는 유해균의 증식을 억제하며, 면역세포를 활성화시켜 체내 항상성을 유지하는 역할을 한다[7]. 세포독성을 유발하지 않는 적절한 양의 NO 생성은 선천성 면역체계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[11-13]. 본 연구에서는 RAW 264.7 대식세포에 NSE를 가하고 NO 생성에 미치는 영향을 평가하였다. 양성대조군으로 사용되는 LPS (1 µg/mL)는 일반적으로 염증을 유도하는 농도로 사용되고 있다[14,15]. 본 실험에서 NSE를 농도별(50, 100 µg/mL)로 처리하였을 때, LPS 군과 비교하여 73.6% 낮은 양이지만, 무처리 대조군과 비교하여 NO 생성을 유의적으로 증가시켰다(Fig. 1A). 연자육의 NO 생성 증가활성과 타 천연물의 활성 증가에 대해서 비교하였다. Yo Han Hong 등은 *Morinda citrifolia noni* 열수 추출물이 면역반응을 수행하는 NO 생성을 대조군 대비 105% 증가시켰으나[16] 반면, 본 결과에서 연자육은 대조군 대비 NO 생성을 115%로 증가시켜 이보다 우수한 면역증강 활성을 나타낸다고 할 수 있다.

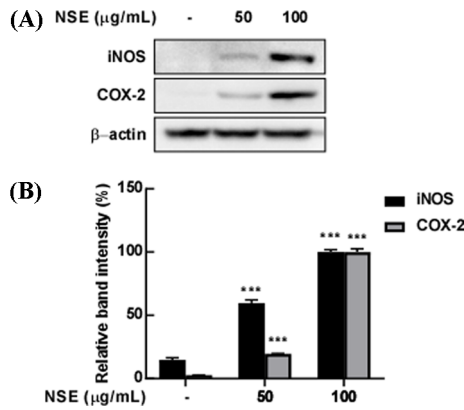


Fig. 2 The effects of NSE on iNOS protein and COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells. The RAW 264.7 cells were treated with NSE at 50, 100 µg/mL for 24 h. (A) NSE significantly induces expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. (B) Quantification of iNOS/β-actin and COX-2/β-actin expression. Expression of iNOS, COX-2, and β-actin was detected by Western Blot. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments. ****p* < 0.001 represents a significant difference compared with the control group

따라서, NSE가 염증을 유발하지 않는 농도의 NO를 생성하여 면역력 증진에 기여할 수 있다는 것을 확인하였다. ROS는 외부물질 감염 시 체내 방어기반을 강화하여 병원체로부터 신체를 보호하는 역할을 수행한다고 알려져 있다[7]. ROS에 반응하는 형광 프로브(fluorescence probe)인 DCF-DA를 RAW 264.7 세포에 가하고 NSE가 ROS 생성에 미치는 영향을 평가하였다. NSE (50, 100 µg/mL)를 가했을 때, 대조군 대비 ROS 생성을 157.9%로 유의하게 증가함을 확인하였다(Fig. 1B, 1C). NSE의 세포독성 여부를 확인하기 위해 RAW 264.7 대식세포에 대한 MTT assay를 진행하였다. 주어진 NSE 농도(50, 100 µg/mL)에서 유의적인 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 1D).

RAW 264.7 대식세포에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 대한 NSE의 효과

iNOS는 대식세포와 같은 선천성 면역세포에서 NO를 생성하여 병원체를 사멸하는 효소이며, cyclooxygenase-2 (COX-2)는 염증성 인자로 prostaglandin-endoperoxide synthase 2를 발현시킨다[17]. iNOS와 COX-2가 비정상적으로 높게 발현되면 염증과 같이 인체에 악영향을 미칠 수 있지만 적절한 농도에서는 면역 반응이 촉진된다고 알려져 있다[18]. Fig. 1A에서 NO의 생성량이 NSE처리에 의해 증가함을 관찰하였기 때문에, NO 생성에 직접적으로 관여되어 있는 iNOS 발현에 대한 NSE의 영향을 평가하였다. COX-2는 NF-κB에 의해 전사되는 표적 유전자이며, 면역증강의 지표로서 측정하였다[18]. 실험결과, NSE에 의해 iNOS와 COX-2 발현이 대조군에 비해 유의하게 증가함을 확인하였다(Fig. 2A, 2B).

RAW 264.7 대식세포에서 cytokines (IL-6, TNF-α) 수준에 대한 NSE의 효과

사이토카인은 신호전달 물질로 면역체계를 활성화시키고 선천성 면역과 획득 면역(acquired immunity) 간 상호작용에 주요한

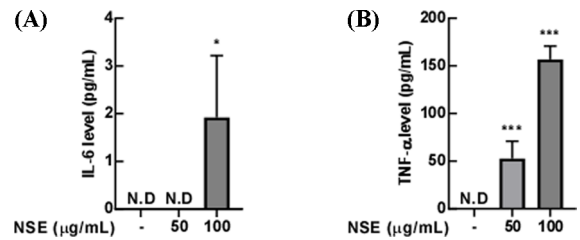


Fig. 3 The effects of NSE on IL-6 and TNF-α levels in RAW 264.7 cells. The RAW 264.7 cells were treated with NSE at 50, 100 µg/mL for 24 h. (A, B) NSE significantly enhances level of IL-6 and TNF-α in cell culture supernatants. Level of cytokines was analyzed by ELISA. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments. **p* < 0.05 and ****p* < 0.001 represent a significant difference compared with the control group

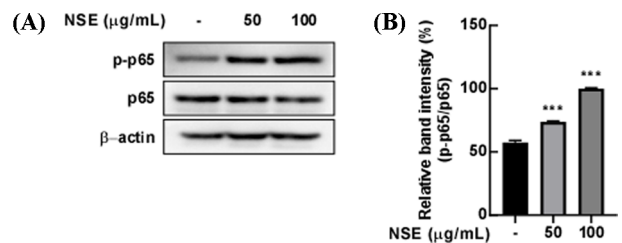


Fig. 4 The effects of NSE on phosphorylation of p65 in RAW 264.7 cells. The RAW 264.7 cells were treated with NSE at 50, 100 µg/mL for 30 min. (A) NSE induces phosphorylation of p65 in RAW 264.7 cells. (B) Quantification of p-p65/p65 expression. Phosphorylation of p65 and expression of p65 and β-actin were detected by Western Blot. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments. ****p* < 0.001 represents a significant difference compared with the control group

역할을 한다[17]. 그 중 IL-6와 TNF-α는 감염과 조직손상에 의해 대식세포가 활성화되면 분비되어 면역반응을 유도한다[19]. 본 연구에서는 IL-6와 TNF-α ELISA kit를 이용하여, NSE가 사이토카인 생성에 미치는 영향을 평가하였다. NSE를 농도별(50, 100 µg/mL)로 처리한 후 세포 상등액에서 사이토카인(IL-6, TNF-α)을 검출하였다. 대조군과 비교하여 처리군에서 사이토카인의 발현량은 유의하게 증가하였다(Fig. 3). 따라서 NSE는 IL-6, TNF-α의 발현 증가를 통해 면역 체계 활성화에 기여하여 체내 면역 증진에 도움을 줄 수 있을 것으로 예상된다.

RAW 264.7 대식세포에서 p65의 인산화에 대한 NSE의 효과

활성화된 NF-κB는 핵으로 이동하여 특정 프로모터(promoter)와 결합하여, 타겟유전자의 전사를 촉진한다[20,21]. NF-κB는 IL-6, TNF-α와 같은 사이토카인의 생성뿐만 아니라 iNOS 유전자의 발현을 통해 NO의 생성을 촉진하여 대식세포의 면역반응에 중요한 역할을 한다[22]. 앞선 결과에서, NSE가 NF-κB 타겟 유전자인 IL-6, TNF-α 그리고 iNOS의 발현을 촉진하였기 때문에, NSE가 NF-κB 신호전달경로 조절에 관여하는 지 평가하기 위해 p65의 인산화를 평가하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때, NSE의 농도별(50, 100 µg/mL) 처리에서 p65의 인산화가 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 4). Herbert Ryan Marini와 Giuseppe Maurizio Campo는 형질전환 벼 종자

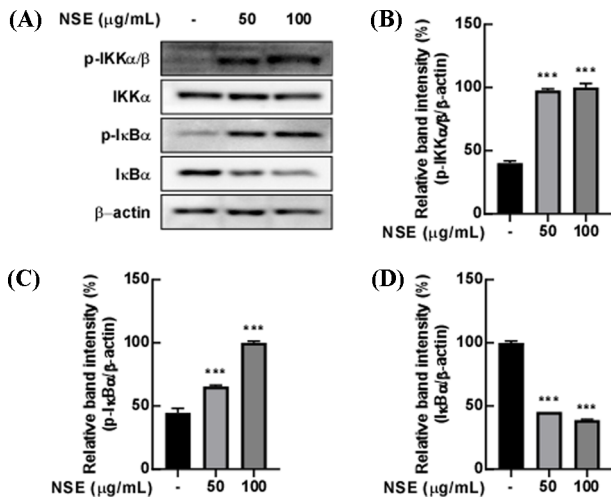


Fig. 5 The effects of NSE on activation of NF-κB signaling pathway in RAW 264.7 cells. The RAW 264.7 cells were treated with NSE at 50, 100 μg/mL for 30 min. (A) NSE induces phosphorylation of IKKα/β and IκBα in RAW 264.7 cells. Also, NSE induces degradation of IκBα in RAW 264.7 cells. (B-D) Quantification of protein/β-actin expression. Phosphorylation of IKKα/β and IκBα and expression of IκBα and β-actin were detected by Western Blot. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments. ****p* < 0.001 represents a significant difference compared with the control group

(Transgenic Rice Seed) 추출물이 p65 인산화를 증가시켜 대식 세포의 활성화를 강화하고 면역활성 효능을 나타냄을 보고한 바 있다. 따라서, 추출물에 의한 p65의 인산화는 면역 증강과 상관 관계가 높다고 할 수 있다[23].

RAW 264.7 대식세포에서 NF-κB signaling pathway의 활성화에 대한 NSE의 효과

NF-κB 신호전달경로에서 p65의 상위조절인자로 IKK α/β와 IκB α가 있다. NF-κB 신호전달경로가 활성화되면 IKK α/β와 IκB α는 인산화되며, IκB α가 NF-κB에서 degradation된다[20,21]. p65의 상위조절인자에 대한 NSE의 영향을 평가하기 위해 RAW 264.7 대식세포에서 IKK α/β 및 IκB α의 인산화와 IκB α의 분해활성을 평가하였다. IKK α/β와 IκB α는 대조군과 비교하였을 때, NSE의 농도별(50, 100 μg/mL) 처리에 의해 인산화가 유의하게 증가하였다. 또한, IκB α는 NSE의 농도별(50, 100 μg/mL) 처리에 의해 degradation되어 발현량이 유의적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 5).

본 연구를 통해 NF-κB 신호전달경로의 IKK α/β/IκB α/p65는 NSE에 의해 활성화되며, iNOS 발현, NO와 사이토카인 생성을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 결과를 종합하면, NSE는 체내의 대식세포를 활성화시켜 면역력 증진에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 기능성 소재로 판단된다.

이러한 결과는 *in vivo*에서 재현되는지에 대한 평가가 필요하며, 또한 NSE의 면역 증강 효과를 지닌 기능성분의 정성 및 정량 분석에 대한 연구가 추가로 진행되어야 한다.

초 록

코로나바이러스-19로 인한 세계적인 팬데믹 이후 면역력 강화 소재에 대한 관심이 급격히 증가하고 있으므로 산업적, 건강적 측면에서 새로운 소재의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 연자육 추출물을 소재로 선정하고 RAW 264.7 쥐 대식세포를 이용하여 면역증진 효과를 평가하였다. 연자육 추출물은 RAW 264.7 세포에서 세포 생존력에 독성을 나타내지 않으면서 nitric oxide 및 reactive oxygen species의 생산을 상향 조절하였다. 또한 연자육 추출물은 RAW 264.7 세포에서 inducible nitric oxide synthase 및 cyclooxygenase-2 발현을 크게 증가시켰다. Enzyme-linked immunosorbent assay 결과에서는 연자육 추출물의 처리가 RAW 264.7 세포에서 interleukin 6 및 tumor necrosis factor-α의 생성을 유의미하게 향상시키는 것으로 나타났다. 또한 연자육 추출물이 p65, I kappa B kinase α/β, 및 I kappa B (IκB) α의 인산화를 크게 상향 조절하고, RAW 264.7 세포에서 IκB α의 발현을 하향 조절하였다. 우리의 연구 결과는 연자육 추출물이 Nuclear factor-kappa B 신호전달 경로를 통해 면역력을 향상시킬 수 있는 잠재적인 건강기능식품 소재가 될 수 있음을 나타낸다.

Keywords 건강기능식품 · 면역력 증진 · 사이토카인 · 선천성 면역 · Nitric oxide · Nuclear factor-kappa B · Reactive oxygen species

감사의 글 본 연구는 2022년 경상북도기술원의 1팀 1교수 책임제 공동연구 '경북 식재료 활용K-면역 농식품 기술개발' (과제번호: LP0048882022) 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

References

- Cassandra C, Elizabeth K, Leonard HC (2022) Long COVID and rheumatology: Clinical, diagnostic, and therapeutic implications. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 101794. doi: 10.1016/j.berh.2022.101794
- Lee J, Kwan Y, Lee JY, Shin JI, Lee K H Lee, Hong SH, Han YJ, Kronbichler A, Smith L, Koyanagi A, Jacob L, Choi S, Ghayda RA, Park M (2021) Public Interest in Immunity and the Justification for Intervention in the Early Stages of the COVID-19 Pandemic: Analysis of Google Trends Data. *J Med Internet Res* 23(6): e26368. doi: 10.2196/26368
- Tripathy S, Verma DK, Thakur M, Patel AR, Srivastav PP, Singh S, Gupta AK, Chávez-González ML, Aguilar CN, Chakravorty N, Verma HK, Utama GL (2021) Curcumin Extraction, Isolation, Quantification and Its Application in Functional Foods: A Review With a Focus on Immune Enhancement Activities and COVID-19. *Front Nutr* 21(8): 747956. doi: 10.3389/fnut.2021.747956
- Dong Y, Jiang W, Wu P, Liu Y, Kuang S, Tang L, Tang W, Zhou X, Feng L (2022) Novel Insight Into Nutritional Regulation in Enhancement of Immune Status and Mediation of Inflammation Dynamics Integrated Study In Vivo and In Vitro of Teleost Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*): Administration of Threonine. *Front Immunol* 13: 770969. doi: 10.3389/fimmu.2022.770969
- Huang Q, Wang J, Zong R, Wu D, Jin C (2022) A Water-Soluble Polysaccharide from the Fibrous Root of *Anemarrhena asphodeloides* Bge. and Its Immune Enhancement Effect in Vivo and in Vitro. *Evid*

- Based Complement Alternat Med 2022; 8723119. doi: 10.1155/2022/8723119
6. Peng X, Feng L, Jiang W, Wu P, Liu Y, Jiang J, Kuang S, Tang L, Zhou X (2019) Supplementation exogenous bile acid improved growth and intestinal immune function associated with NF-kappaB and TOR signalling pathways in on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Enhancement the effect of protein-sparing by dietary lipid. *Fish Shellfish Immunol* 92: 552–569. doi: 10.1016/j.fsi.2019.06.047
 7. Li C, Dong Z, Zhang B, Huanga Q, Liu G, Fu X (2020) Structural characterization and immune enhancement activity of a novel polysaccharide from *Moringa oleifera* leaves. *Carbohydr Polym* 234: 115897. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115897
 8. Ding H, Shi J, Wang Y, Guo J, Zhao J, Dong L (2011) Neferine inhibits cultured hepatic stellate cell activation and facilitates apoptosis: A possible molecular mechanism. *Eur J Pharmacol* 650(1): 163–169. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.10.025
 9. Sugimoto Y, Nishimura K, Itoh A, Tanahashi T, Nakajima H, Oshiro H, Sun D, Toda T, Yamada J (2015) Serotonergic mechanisms are involved in antidepressant-like effects of bisbenzylisoquinolines liensinine and its analogs isolated from the embryo of *Nelumbo nucifera* Gaertner seeds in mice. *J Pharm Pharmacol* 67(12): 1716–1722. doi: 10.1111/jphp.12473
 10. Youn UJ, Lee J, Lee Y J, Nam J W, Bae H, Seo E (2010) Regulation of the 5-HT3A receptor-mediated current by alkyl 4-hydroxybenzoates isolated from the seeds of *Nelumbo nucifera*. *Chem Biodivers* 7(9): 2296–2302. doi: 10.1002/cbdv.200900393
 11. Bharathi Priya L, Huang C, Hu R, Balasubramanian B, Baskaran R (2021) An updated review on pharmacological properties of neferine-A bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nelumbo nucifera*. *J Food Biochem* 45(12): e13986. doi: 10.1111/jfbc.13986
 12. So BR, Bach TT, Paik JH, Jung SK (2020) *Kmeria duperreana* (Pierre) Dandy Extract Suppresses LPS-Induced iNOS and NO via Regulation of NF-κB Pathways and p38 in Murin Macrophage RAW 264.7 Cells. *Prev Nutr Food Sci* 25(2): 166–172. doi: 10.3746/pnf.2020.25.2.166
 13. Kim MJ, Kim DW, Kim JG, Shin Y, Jung SK, Kim Y-J (2021) Analysis of the Chemical, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties of Pink Pepper (*Schinus molle* L.). *Antioxidants* 10(7): 1062. doi: 10.3390/antiox10071062
 14. Lee WJ, Li WY, Lee SW, Jung SK (2021) Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of *Sorosaris hirsuta* Extract by Regulating iNOS/NF-κB and NRF2/HO-1 Pathways in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. *Applied Sciences* 11(10): 4711. doi: 10.3390/app11104711
 15. Yeung YK, Kang Y, So BR, Jung SK, Chang YH (2021) Structural, antioxidant, prebiotic and anti-inflammatory properties of pectic oligosaccharides hydrolyzed from okra pectin by Fenton reaction. *Food Hydrocolloids* 118: 106779. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106779
 16. Song JH, Kwak S, Kim H, Jun W, Lee J, Yoon HG, Kim Y, Choi KC (2019) *Dendropanax moribifera* Branch Water Extract Increases the Immunostimulatory Activity of RAW264.7 Macrophages and Primary Mouse Splenocytes. *J Med Food* 22(11): 1136–1145. doi: 10.1089/jmf.2019.4424
 17. Trinh TA, Park J, Oh JH, Park JS, Lee D, Kim CE, Choi HS, Kim SB, Hwang GS, Koo BA, Kang KS (2020) Effect of Herbal Formulation on Immune Response Enhancement in RAW 264.7 Macrophages. *Biomolecules* 10(3): 424. doi: 10.3390/biom10030424
 18. García-Ortiz A, Serrador JM (2018) Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends Mol Med* 24(4): 412–427. doi: 10.3390/biom10030424
 19. Somensia N, Rabelo TK, Guimaraes AG, Quintans-Junior LJ, Souza Araújo AA, Moreira JCF, Gelain DP (2019) Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-κB pathway. *Int Immunopharmacol* 75: 105743. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105743
 20. Facchin BM, Reis GO, Vieira GN, Bramorski Mohr ET, Salvan da Rosa J, Kretzer IF, Demarchi IG, Dalmarco EM (2022) Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Res* 71(7-8): 741–758. doi: 10.1007/s00011-022-01584-0
 21. Hong YH, Yi YS, Han SY, Aziz N, Kim HG, Park SH, Hossain MA, Baik KS, Choi SY, Lee J, Kim JH, Cho JY (2019) *Morinda citrifolia* noni water extract enhances innate and adaptive immune responses in healthy mice, ex vivo, and in vitro. *Phytother Res* 33(3): 676–689. doi: 10.1002/ptr.6256
 22. Lee SM, Choi W, Shi WR, Kim YH, Min J (2021) Enhanced Immune Response by Vacuoles isolated from *Saccharomyces cerevisiae* in RAW 264.7 Macrophages. *Biosci Rep* 41(9): BSR20211158. doi: 10.1042/BSR20211158
 23. Hong SH, Ku JM, Kim HI, Ahn CW, Park SH, Seo HS, Shin YC, Ko SG (2017) The immune-enhancing activity of *Cervus nippon manchuricus* extract (NGE) in RAW264.7 macrophage cells and immunosuppressed mice. *Food Res Int*, 99(Pt 1): 623–629. doi: 10.1016/j.foodres.2017.06.053
 24. Ogasawara N, Matsushima M, Kawamura N, Atsumi K, Yamaguchi T, Ochi H, Kusatsugu Y, Oyabu S, Hashimoto N, Hasegawa Y, Ueyama J, Kawabe T (2017) Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon. *Toxicology* 379: 22–30. doi: 10.1016/j.tox.2017.01.014
 25. Monmai C, Go SH, Shin I, You SG, Lee H, Kang SB, Park WJ (2018) Immune Enhancement Effect of *Asterias amurensis* Fatty Acids through NF-kappaB and MAPK Pathways on RAW 264.7 Cells. *J Microbiol Biotechnol* 28(3): 349–356. doi: 10.4014/jmb.1709.09005
 26. Monmai C, Go SH, Shin IS, You SG, Lee H, Kang SB, Park WJ (2018) Immune-Enhancement and Anti-Inflammatory Activities of Fatty Acids Extracted from *Halocynthia aurantium* Tunic in RAW264.7 Cells. *Mar Drugs* 16(9): 309. doi: 10.3390/md16090309
 27. Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR, Proia RL, Ferdek P, Hedrick CC (2008) Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res* 102(8): 950–958. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.170779
 28. Monmai C, Kim JS, Baek SH (2022) Transgenic Rice Seed Extracts Exert Immunomodulatory Effects by Modulating Immune-Related Biomarkers in RAW264.7 Macrophage Cells. *Nutrients* 14(19): 4143. doi: 10.3390/nu14194143