



The immune enhancement effect of Cheonggukjang Water Extract (CWE) via activation of NF- κ B pathways in murine macrophage RAW 264.7 cells

Sehyeon Jang¹ · San Kim¹ · Se Jeong Kim¹ · Sung Ran Yoon² ·
Bo Ram So³ · Jung A Ryu² · Jeong Min Park² · Sung Keun Jung

RAW 264.7 대식세포에서 청국장 열수 추출물(Cheonggukjang Water Extract, CWE)의 면역 증강 효과

장세현¹ · 김 산¹ · 김세정¹ · 윤성란² · 소보람³ · 류정아² · 박정민² · 정성근^{1,4}

Received: 10 June 2023 / Accepted: 30 June 2023 / Published Online: 11 July 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Due to the COVID-19 pandemic, the immune-enhancing health functional food market that protects our bodies from pathogens such as viruses continues to grow. In this study, we aimed to prove the Cheonggukjang, a high-nutrient food with high protein, fat, and dietary fiber content, as an immune-enhancing nutraceutical. Cheonggukjang water extract (CWE) increased the production of nitric oxide, reactive oxygen species, and cytokines such interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α without affecting viability in RAW 264.7 cells. Furthermore, CWE significantly upregulated the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 cells. CWE enhanced the phosphorylation of I kappa B kinase α/β and I kappa B (I κ B) α , as well as the degradation of

I κ B α . CWE also induced increased phosphorylation of nuclear factor-kappa B p65 and facilitated the redistribution of p65 from the cytoplasm to the nucleus in RAW 264.7 cells. These findings suggest that CWE has potential as a health functional food material that can enhance the innate immune response.

Keywords Cheonggukjang water extract · Cytokines · Health Functional Food · Innate Immune enhancing · Nuclear factor-kappa B

서 론

코로나바이러스19(COVID-19)의 세계적 대유행(Pandemic)으로 감염역제 건강기능식품에 대한 관심이 증가했으며, 고령화, 건강한 삶에 대한 니즈(Needs)로 건강기능식품 시장 규모는 성장하고 있다. 특히, 2020년 건강기능식품 매출 현황 중에서도 홍삼 및 인삼, 클로렐라를 기능성 원료로 하는 면역력기능 개선 품목의 판매율이 13.3%로 가장 높았다[1]. 코로나와 같은 감염성 질환으로부터 우리 몸을 보호하기 위해서는 초기 방어 기작인 선천성 면역(Innate immunity)이 매우 중요하다. 선천성 면역 반응이 결여될 경우 Sandhoff disease와 같은 뇌 질환, 심각한 호흡기 질환인 급성 호흡곤란 증후군(ARDS) 등의 질병으로 진행될 수 있다[2]. 선천성 면역에 관여하는 세포로는 대식세포, 수지상 세포, 자연살해세포 및 선천성 림프구 세포 등이 존재한다[3]. 특히, 대식세포는 세균, 바이러스, 기생충 감염 시 M1 표현형으로의 분화되어[4], nitric oxide (NO)와 reactive oxygen

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

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

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

³COSMAX NBT, INC., Seongnam 13486, Republic of Korea

⁴Research Institute of Tailored Food Technology, Kyungpook National University, Daegu, Korea 41566, 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.

species (ROS) 같은 항균 물질을 생산하여 병원체를 직접적으로 제거하는 항균작용 뿐만 아니라 사이토카인과 같은 신호전달 매개체를 생산하여 B 세포와 T 세포로 대표되는 획득면역 (Adaptive immunity)의 성숙화(Maturation)와 활성을 촉진시키는 역할을 수행한다[4,5].

대식세포의 세포막에 존재하는 패턴인식수용체(Pattern Recognition Receptor)는 외부 침입분자를 병원체연관분자유형(Pathogen Associated Molecular Pattern)으로 인식하여 다양한 면역반응을 나타낸다[6]. 수용체로부터 매개된 면역반응을 나타내는 주요한 신호전달 인자 중, nuclear factor (NF)-κB는 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현과 사이토카인(Cytokine) 생성의 주된 전사인자로 알려져 있으며, 다양한 질환에 있어 중요한 조절자 역할을 수행한다[7,8]. NF-κB는 p65와 p50의 이량체로 구성되어 있으며, NF-κB 저해 역할을 하는 IκBα에 결합하여 불활성화된 상태로 존재한다. 그러나 외부 자극에 의해 활성화된 I kappa B kinase (IKK)α/β가 IκBα를 인산화하면, IκBα는 분해되고 자유롭게 핵으로 이동한 NF-κB는 특정 promoter에 결합하여 해당전자의 발현을 촉진한다[9].

청국장(은 한국의 전통 발효 식품으로, *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus natto* 생산효소에 의해 제조된다. 청국장은 높은 조단백, 조지방, 펩톨 및 플라보노이드 함량과 함께 높은 식이섬유 함량을 가지는 고영양식품으로 알려져 있다[10,11]. 특히, 청국장은 염증성 장질환 예방, 지방세포 분화억제를 통한 항비만 및 항산화, 면역자극 등의 생리활성을 나타낸다[12-15]. 하지만, RAW 264.7 세포에서 청국장 열수 추출물 단독처리의 선천성 면역반응 개선에 관한 연구결과는 보고된 바 없다.

이 연구는 CWE가 면역증강 지표의 영향평가를 통해 잠재적인 면역기능개선 건강기능식품으로써의 가능성을 제시하고 자 하였다. CWE는 NO, ROS 및 사이토카의 생성을 유의적으로 증가하였고, IKKα/β, IκBα, p65의 인산화를 증가시켜, p65가 세포질에서 핵으로의 이동을 촉진하였다. 이를 통해 CWE가 면역 기능을 증진시킬 수 있는 유용한 면역 강화 소재가 될 수 있음을 시사한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin/streptomycin solution)는 Thermo Fisher Scientific (Logan, UT, USA)로부터 구입하였다. p-p65 (Ser536), IKKα, IκBα, p-IKKα/β (Ser176/180), p-IκBα (Ser32), cyclooxygenase (COX)-2, iNOS, α/β-Tubulin 1차 항체와 *Escherichia coli* O111:B4 유래 LPS는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. p65 및 Lamin B1 1차 항체는 Abcam (Cambridge, Cambridgeshire, UK)로부터 구입하였다. β-Actin 1차 항체는 Santa Cruz

Biotech (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. 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

청국장 분말 시료는 시중에서 유통되어지는 상품 중 판매량이 높은 1, 2순위(C사, S사) 제품을 구입하여 1:1로 혼합하여 시료로 사용하였다. 청국장 분말시료의 일반성분 및 아미노산 함량은 Table 1과 같다. 혼합된 청국장 시료에 3차 증류수를 1:30 비율로 첨가하여 80 °C, 4시간 동안 항온수조(VS-1205SW1, Shaking water bath, Vision scientific, Bucheon, Korea)에서 추출하였다. 8,000 rpm 조건으로 30분간 원심분리하여 여과한 후, 얻은 상층액을 40 °C에서 농축하고 동결건조하였다. 이렇게 동결건조된 청국장 추출 분말을 멸균 DW에 녹여 시료로 사용하였다.

세포 배양

마우스 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLRF, Korean Cell Line Research Foundation, Seoul, Korea)에서 구입하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS와 1% 항생제(100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin)가 첨가된 DMEM를 이용해 배양하였다. RAW 264.7 세포는 37 °C, 5% CO₂ 조건의 CO₂ incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

세포 독성 평가

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 3×10⁵ cells/mL 농도로 well 당 100 µL씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. CWE를 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리해주었다. 24시간 후, 5 mg/mL Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide (MTT) 시약(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 well 당 10 µL씩 분주하였다. MTT시약 처리 2시간 후, 배지를 well 당 80 µL씩 제거하고 Dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich)를 100 µL씩 첨가해주었다. 30분 동안 shaker에서 100 rpm으로 반응시킨 후, 550 nm에서 microplate reader (Bio-Rad Inc, Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Nitrite 생성 평가

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 3×10⁵ cells/mL 농도로 well 당 200 µL씩 분주하여 overnight하여 배양하였다. CWE를 25, 50, 100 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 well 당 세포 배양액 100 µL와 Griess 시약[(0.2% N-(1-naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride+5% phosphoric acid 속 1% sulfanilamide (1:1 비율)] 100 µL를 혼합하여 30분 동안 shaker에서 100 rpm으로 반응시킨 후, 550 nm에서 microplate reader (Bio-Rad Inc)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Sodium

Table 1 Composition and amino acid content of Cheonggukjang powder samples

Moisture (g/100 g)	Protein (g/100 g)	Total amino acid (mg/100 g)	Essential amino acid (mg/100 g)	Lipid (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Total Fiber (g/100 g)
4.62±0.01	42.12±0.20	33705.21±884.50	12611.30±327.28	21.70±0.06	4.95±0.02	33.09±0.61

nitrite를 농도별로 희석하여 Nitrite의 표준곡선으로 이용하였다.

ROS 생성 평가

RAW 264.7 세포 내 생성된 ROS는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 사용하여 형광 판독기와 형광 형미경을 통해 관찰하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 3×10^5 cells/mL 농도로 분주하여 overnight 동안 배양하였다. CWE를 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 200 μL 데워진 PBS로 well 당 200 μL 씩 두 번 세척해주었다. Serum free media에 20 μM DCF-DA를 처리하여 30분 동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 염색된 배지를 완전히 제거하고 200 μL 의 PBS로 두 번 세척한 후, microplate fluorometer (Molecular Device, San Jose, CA, USA)를 사용하여 485-530 nm에서 형광을 측정하였다. 더불어, fluorescence microscopy (Leica, Wetzlar, Germany)와 LAS X microscope software (Leica)를 사용하여 세포 내 형성된 ROS를 관찰하였다.

사이토카인 생성 평가

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. CWE를 농도별로 처리 후 24시간 후, 배지의 상층액을 취하였다. Mouse IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , 및 IL-1 β uncoated ELISA kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 사용하여 제조사의 설명에 따라 상층액 내의 사이토카인 함량을 분석하였다.

Western blot 분석

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 3×10^5 cells/mL 농도로 분주하여 overnight하여 배양하였다. CWE를 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 반응시간인 30분 또는 24시간 동안 배양하였다. 반응 시간이 된 세포를 차가운 PBS로 2번 세척한 후, protease와 phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific)이 포함된 lysis buffer (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA)를 Well 당 200 μL 씩 넣어 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 30분 동안 10분에 한 번씩 voltexing 하여 세포 용해가 이루어지도록 하였다. 30분이 지난 후, 4°C, 13,652 \times g 조건으로 15분 동안 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 단백질 정량은 DC Protein Assay Kit reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 이용하여 진행하였다. 이후의 과정은 [16]와 동일하다.

세포질 및 핵 분획의 분리

CWE에 의한 p65의 핵 내로의 전위를 확인하기 위해 세포질 및 핵 분획의 분리를 진행하였다. RAW 264.7 세포를 6 cm dish에 3×10^5 cells/mL 농도로 well 당 5 mL씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. CWE를 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 30분 동안 배양하였다. 세포를 차가운 PBS로 2번 세척한 후, PBS를 well 당 1 mL씩 분주하여 스크래퍼로 긁어 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 300 \times g 조건으로 4°C에서 5분 동안 원심분리 하여 상층액을 완벽하게 제거한 후, 침전된 세포에 Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific)을 100 μL 씩 넣어 voltexing하여 10분 동안 얼음에 두었다. Cytoplasmic Extraction Reagent II를 5.5 μL 씩 넣어 voltexing

하여 1분 동안 얼음에 둔 후, 다시 voltexing하여 16,000 \times g 조건으로 4°C에서 5분 동안 원심분리 하였다. 분리된 세포질 분획인 상층액을 취한 후, 남아 있는 침전물에 Nuclear Extraction Reagent를 50 μL 씩 넣어 40분 동안 10분에 한 번씩 voltexing 하였다. 40분 후, 16,000 \times g 조건으로 4°C에서 10분 동안 원심분리 하여 분리된 핵 분획인 상층액을 취하였다. 분리된 세포질과 핵 분획의 단백질은 western blot 방법을 통해 분석하였다.

면역 형광 분석(Immunofluorescence)

RAW 264.7 세포를 8-well chamber (ibidi, GmbH, Germany)에 1×10^5 cells/mL 농도로 well 당 200 μL 씩 분주하여 overnight 동안 배양하였다. CWE를 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 반응시간인 30분 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 1회 세척한 후, 4% formaldehyde로 고정시켰다. 15분 후, PBS로 3회 세척하고 차가운 100% methanol을 -20°C에서 15분 동안 처리하여 세포를 투과화 시켰다. 세포를 1시간 동안 blocking buffer (5% FBS와 0.3% Tween 20 포함)를 이용하여 blocking하고 1차 항체인 anti-p65를 antibody buffer에 녹여 세포에 처리한 후 4°C에서 overnight 동안 반응시켰다. 이후 Alexa Fluora 594 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)가 접합된 Goat anti-Mouse IgG H&L 2차 항체를 1시간 반응시킨 후 DAPI (VECTASHIELD: Vector Laboratories, Newark, CA, USA)로 핵을 염색시켰다. NF- κB p65의 translocation은 fluorescence microscopy (Leica-Microsystems)로 시각화 하였다.

통계 분석

모든 실험 결과는 GraphPad Prism 9 software (Graph Pad, San Diego, CA, USA)를 통하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 실험군 간의 다중 비교는 one-way analysis of variance 및 t-test를 통하여 이루어졌다. 통계적 유의성은 대조군과 실험군과 비교하여 $p < 0.05$ 으로 기준을 정하였다.

결과 및 고찰

CWE가 RAW 264.7 세포에서 NO 생산에 미치는 영향

대식세포에 의해 생성된 NO는 바이러스와 세균과 같은 외부부원균을 사멸시켜 여러 감염성 질환 예방에 중요한 역할을 한다 [17]. 우리는 RAW 264.7 세포에서 CWE가 NO 생산에 미치는 영향을 평가하였다. RAW 264.7 세포에 CWE의 농도 별(25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) 처리는 NO의 생산을 유의적으로 증가시켰다 (Fig. 1A). 그람 음성 세균의 outer membrane 성분인 LPS (Lipopolysaccharide)는 RAW 264.7 세포에서 면역반응의 양성 대조군으로 활용되지만 [18,19], LPS로 인해 과도하게 생성된 NO는 항균활성 이외에도 염증반응을 유발한다고 알려져 있다 [16]. CWE의 NO 측정결과 무처리군에 비해 유의적으로 증가하였지만, LPS 처리군에 비해 유의적으로 낮은 NO 생성을 나타내어, LPS 만큼 과도한 염증반응을 나타내지 않을 것으로 추론하였다. 아울러, CWE는 실험에 사용된 모든 농도(25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)에서 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1B). 추후 실험에서 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 최고농도로 설정하여 CWE의 면역활성을 확인하였다.

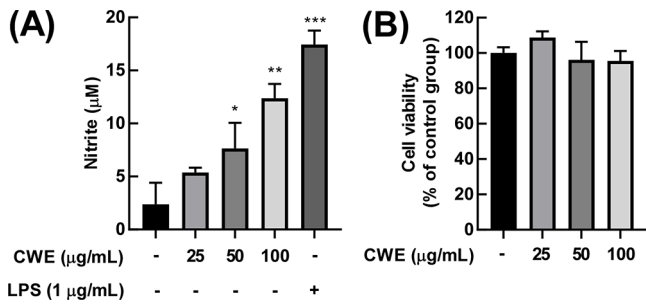


Fig. 1 Effects of CWE on nitrite production and cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated for 24 h with CWE at 25, 50, 100 µg/mL. (A) CWE significantly induced nitrite production in RAW 264.7 cells. Cell viability was evaluated by MTT assay. (B) CWE did not affect cell viability. The data represent the mean ± SD (n=3). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 vs. control group

CWE가 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향

NO는 L-아르기닌(arginine)으로 부터 nitric oxide synthesis (NOS) 효소의 촉매작용에 의해 합성된다. 여러 연구들은 NOS의 억제제가 바이러스, 박테리아 등에 의해 발생한 감염성 질환들을 더욱 악화시키므로 NOS가 숙주 방어에 중요한 역할을 담당함을 보고하고 있다[20]. D. Arias-Salvatierra 등은 iNOS inhibitor인 1400W 처리가 NO 생산을 억제한다는 결과를 통해

iNOS가 NO 생산을 직접적으로 조절함을 확인하였다[21]. COX-2는 염증성 인자인 prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PGE2)의 합성을 촉매하는 효소로써 염증을 유발한다. 하지만, COX-2는 감염 상황에서 병원균 제거를 위해 IL-6, IL-1β 및 TNF-α 사이토카인과 NO 생산을 조절하는 역할을 한다고 알려져 있다[22]. 따라서, CWE가 NOS의 한 종류인 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. CWE 처리에 의해 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 2A, B). 따라서, RAW 264.7 세포에서 CWE는 iNOS와 COX-2의 유의적인 증가를 보이며 면역증진 활성을 나타내었다.

CWE가 RAW 264.7 세포에서 ROS 생산에 미치는 영향

대식세포에서 생산되는 ROS는 직접적으로 침입한 병원균을 죽이는 항균 활성뿐만 아니라 염증성 사이토카인 생산 조절 기능을 가져 선천성 면역에서 가장 주요한 인자이다[23]. CWE로 인해 세포질 내 생산된 ROS를 DCF-DA 형광 분석을 통해 평가하였다. CWE 처리에 의해 RAW 264.7 세포 내 ROS가 농도의존적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 3A, B). Fangfang Wu 등은 RAW 264.7 세포에서 ROS 생성 증가를 통해 chondroitin sulfate 소재의 면역증진 활성을 보고한 바 있다[24]. 따라서, RAW 264.7 세포에서 CWE는 ROS 생산 증가를 통해 면역 증진 효과를 나타내었다.

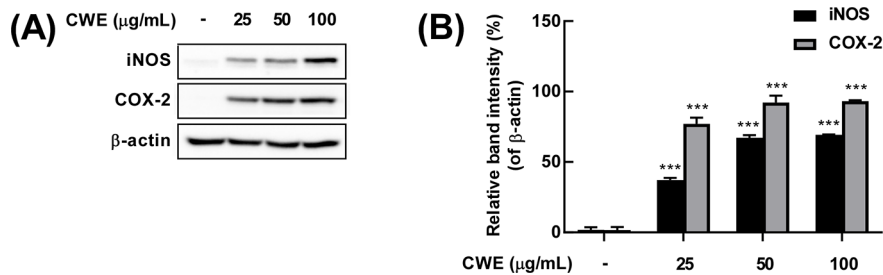


Fig. 2 Effects of CWE on expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated for 24 h with CWE at 25, 50, 100 µg/mL. (A) CWE significantly induced expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. (B) Quantification of iNOS and COX-2 expression by CWE. Expression of iNOS, COX-2, and β-actin was detected by Western Blot. The data represent the mean ± SD (n=3). ****p* < 0.001 vs. control group

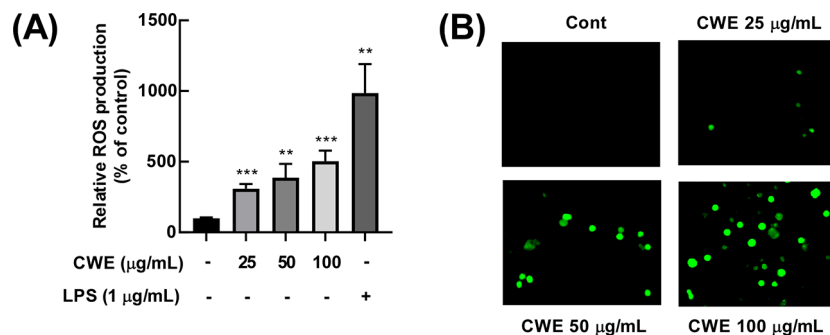


Fig. 3 Effects of CWE on ROS production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated for 24 h with CWE at 25, 50, 100 µg/mL. (A, B) CWE significantly induced ROS production in RAW 264.7 cells. The data represent the mean ± SD (n=3). ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 vs. control group

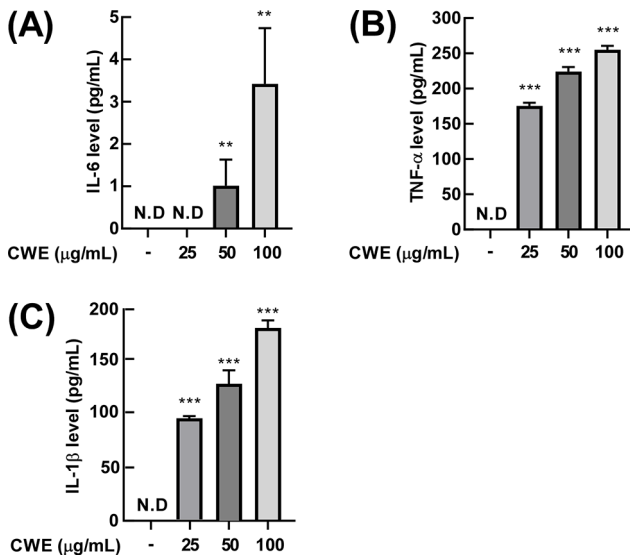


Fig. 4 Effects of CWE on production of IL-6, TNF-α and IL-1β cytokine in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated for 24 h with CWE at 25, 50, 100 μg/mL. production of IL-6, TNF-α and IL-1β cytokine was evaluated by ELISA. (A) CWE induces production of IL-6 in RAW 264.7 cells culture supernatants. (B) CWE induces production of TNF-α in RAW 264.7 cells culture supernatants. (C) CWE induces production of IL-1β in RAW 264.7 cells culture supernatants. The data represent the mean ± SD (n=3). ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 vs. control group

CWE가 RAW 264.7 세포에서 사이토카인(IL-6, TNF-α, IL-1β)생산에 미치는 영향

사이토카인은 면역 세포들의 활성화와 성장을 조절하는 저 분자 단백질 신호전달인자이다[25]. 사이토카인 TNF-α, IL-6 및 IL-

1β는 광범위하게 분포하여 숙주 방어에 중심적인 역할을 하며, 특히 TNF-α와 IL-1β는 선천성 면역과 후천성 면역을 매개하는 주된 사이토카인으로 알려져 있다[26]. CWE로 인해 RAW 264.7 세포에서 방출된 사이토카인의 양을 확인하기 위해 세포 상층액을 얻어 ELISA assay를 진행하였다. 그 결과, CWE의 농도 별 처리에 의해 유의적으로 TNF-α, IL-6 및 IL-1β 사이토카인의 생산이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4A-C).

CWE가 RAW 264.7 세포에서 NF-κB signaling pathway의 활성화에 미치는 영향

우리는 앞선 결과에서 CWE에 의해 면역증강 반응으로써 NO와 IL-6, TNF-α 및 IL-1β 사이토카인의 생산 증가를 확인하였다. NF-κB는 NO 합성 효소인 iNOS와 COX-2 및 사이토카인 생산의 주된 전사인자로서 잘 알려져 있다[7]. 따라서 CWE로 인한 NF-κB p65의 활성을 평가하였다. CWE 처리가 RAW 264.7 세포에서 p65의 인산화를 30분에 유의적으로 증가시킴을 확인하였다(Fig. 5A, B). 다음으로 우리는 p65의 상위조절인자인 IκBα와 IKKα/β의 활성을 평가하였다. IκBα의 degradation과 인산화는 CWE 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 5C, D). 또한, CWE 처리에 의해 IKKα/β의 인산화도 30분에 유의적으로 증가하였다(Fig. 5C, E).

CWE가 RAW 264.7 세포에서 p65의 세포질에서 핵으로의 전위에 미치는 영향

p65의 Ser536 잔기의 인산화와 IκBα의 degradation은 p65가 세포질에서 핵으로 이동하여 특정 promoter에 결합하여 전사인자로서 작용한다[27]. 우리는 CWE가 p65의 핵으로의 전위에 영향을 주는지 확인하기 위하여 세포질과 핵의 분리를 통하여 이를 평가하였다. CWE 처리는 유의적으로 핵 분획에서 p65의 분

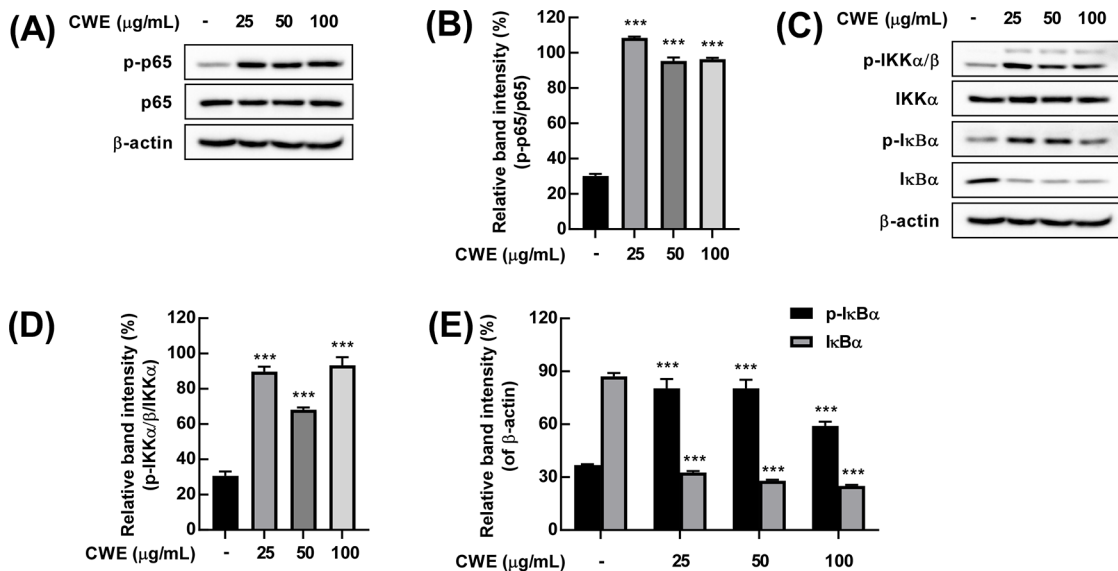


Fig. 5 Effects of CWE on activation of NF-κB signaling pathway in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated for 30 min with CWE at 25, 50, 100 μg/mL. (A) CWE induced phosphorylation of p65 in RAW 264.7 cells. (B) Quantification of p65 phosphorylation by CWE. (C) CWE significantly induced phosphorylation of of IKKα/β and IκBα and degradation of IκBα in RAW 264.7 cells. (D) Quantification of IKKα/β phosphorylation by CWE. (E) Quantification of IκBα phosphorylation and degradation by CWE. Levels of phosphorylation and expression were detected by Western Blot. The data represent the mean ± SD (n=3). ****p* < 0.001 vs. control group

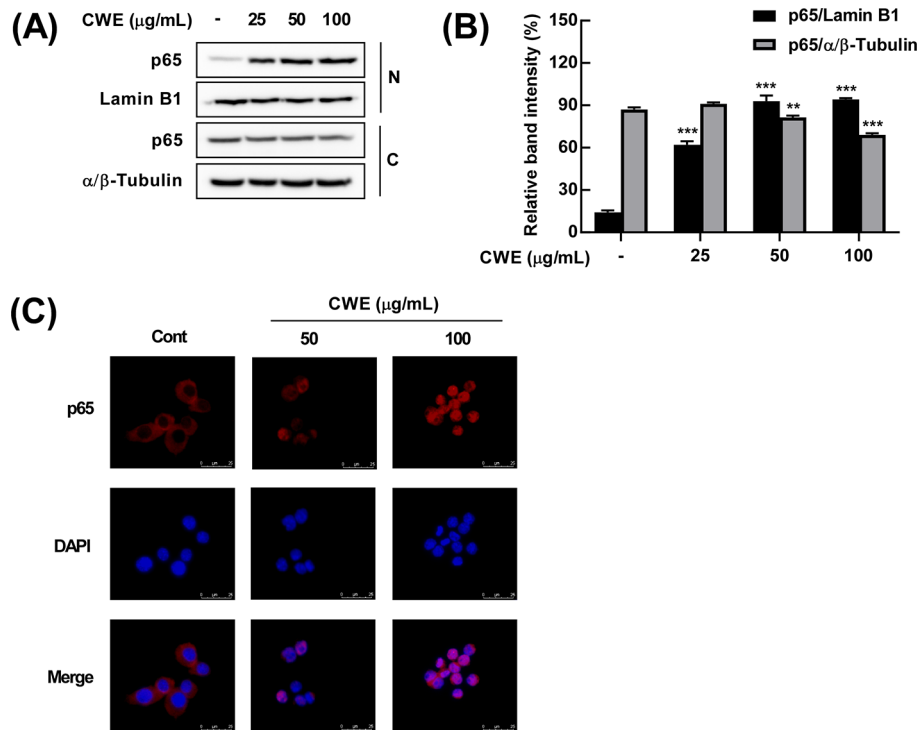


Fig. 6 Effects of CWE on translocation of p65 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated for 30 min with CWE at 25, 50, 100 µg/mL. (A) CWE induced p65 NF-κB nuclear translocation in RAW 264.7 cells. (B) Quantification of nuclear p65 and cytosolic p65. Expressions of p65, Lamin B1, and α/β-Tubulin were detected by Western Blot. RAW 264.7 cells were treated for 30 min with CWE at 50, 100 µg/mL. (C) Immunofluorescence. The data represent the mean ± SD (n =3). ***p* <0.01 and ****p* <0.001 vs. control group

포를 증가시켰으며, 세포질 분획에서는 p65의 분포를 감소시켰다(Fig. 6A, B). 우리는 면역 형광 분석을 통해서 CWE처리가 p65의 핵으로 전위를 유도함을 다시 한번 확인하였다(Fig. 6C).

이를 통해 CWE가 NF-κB 활성을 증가시켜 iNOS, COX-2의 발현과 NO 및 사이토카인의 생성을 촉진한다는 것을 확인하였으며, 이는 CWE가 선천성 면역 세포 중 하나인 대식세포의 활성을 증가시켜 감염 초기의 체내 방어 작용을 수행할 수 있는 유망한 식품 소재임을 시사한다.

면역 활성화는 인삼다당체의 진산이나 곡류의 아라비노자일란과 같은 특정 다당체에 의해 주로 촉진된다는 연구들이 존재하며[28,29], 이러한 측면에서 Table 1과 같이 높은 식이섬유 함량을 가진 청국장 또한 면역 활성화에 직접적인 요인으로 다당체가 작용할 것이라 기대되며 추후, 구체적인 면역 활성화에 기여하는 다당체의 분리 및 구조분석 연구가 필요할 것이라 생각되어진다.

초 록

코로나19 바이러스의 대유행으로 바이러스와 같은 외부 병원균으로부터 우리의 몸을 보호하는 면역 기능 개선 건강기능식품의 시장은 점차 증가하고 있다. 우리는 본 연구에서 높은 조단백, 조지방, 식이섬유 함량을 나타내는 고영양식품인 청국장이 면역 강화 기능을 나타냄을 밝혀내고자 하였다. 청국장 열수 추

출물은 RAW 264.7 세포에서 세포독성을 나타내지 않으며, 대식세포의 nitric oxide, reactive oxygen species 및 interleukin (IL)-6, IL-1β, tumor necrosis factor-α 사이토카인의 생산량을 증가시켰다. 또한, 청국장 열수 추출물은 RAW 264.7 세포에서 inducible nitric oxide synthase 및 cyclooxygenase-2의 발현을 유의적으로 증가시켰다. 청국장 열수 추출물은 RAW 264.7 세포에서 I kappa B kinase α/β와 I kappa B (IκB)α의 인산화 및 IκBα의 degradation을 증가시켰으며, Nuclear factor-kappa B p65의 인산화를 증가시켜 p65의 세포질에서 핵으로의 이동을 촉진하였다. 이러한 연구 결과는 청국장 추출물이 선천성 면역 반응을 강화하는데 유망한 건강기능식품 소재로 활용될 수 있음을 시사한다.

Keywords 건강기능식품 · 사이토카인 · 선천성 면역기능 강화 · 청국장 열수 추출물 · Nuclear factor-kappa B

감사의 글 본 연구는 2022년 경상북도기술원 1팀 1교수 책임제 공동연구 ‘경북 식재료 활용K-면역 농식품 기술개발’ (과제번호: LP0048882022) 연구비 지원과 한국연구재단의 중견연구 (NRF-2022R1A2C1010923) 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Gun-Dong K, So-Young L, Hee Soon S (2022) COVID-19 pandemic

- and the immune regulatory function of foods. *Food Science and Industry* 55: 244–263
2. Kolter J, Henneke P, Groß O, Kierdorf K, Prinz M, Graf L, Schwemmler M (2022) Paradoxical immunodeficiencies-When failures of innate immunity cause immunopathology. *Eur J Immunol* 52: 1419–1430. doi: 10.1002/eji.202149531
 3. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL (2018) An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 14: 49. doi: 10.1186/s13223-018-0278-1
 4. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D (2018) Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci* 19: 1801. doi: 10.3390/ijms19061801
 5. Herb M, Schramm M (2021) Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants (Basel)* 10: 313. doi: 10.3390/antiox10020313
 6. Satoh T, Akira S (2016) Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. *Microbiol Spectr* 4. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016
 7. Jia J, Liu Y, Zhang X, Liu X, Qi J (2013) Regulation of iNOS expression by NF- κ B in human lens epithelial cells treated with high levels of glucose. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 5070–5077. doi: 10.1167/iov.13-11796
 8. Uehara EU, Shida Bde S, de Brito CA (2015) Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity. *Inflamm Res* 64: 845–852. doi: 10.1007/s00011-015-0857-2
 9. Sun SC (2011) Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 21: 71–85. doi: 10.1038/cr.2010.177
 10. Lee B-Y, Kim D-M, Kim K-H (1991) Physico-chemical properties of viscous substance extracted from chungkook-jang. *Korean J Food Sci Technol* 23: 599–604
 11. Hyo-Jin L, Sang AC, Jin-Gi S, Jeong-Sang K, Yong-Jin J, Kwong-Duck M, Joong-Ho K (2007) Quality and Functional Components of Commercial Chungkukjang Powders. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 36: 65–71
 12. Kim J, Yoon B, Yang J, Hwang S, Choi I (2021) Physicochemical Characteristics and Antioxidant Properties of Protein shake Fortified with Cheonggukjang Prepared by *Rhynchosia nulubilis*. *Korean Journal of Human Ecology* 30: 851–860. doi: 10.5934/kjhe.2021.30.5.851
 13. Kim ha r, Seon-Young K, Eun-Mi N, Jong Hyun C, Mi Hee P (2022) Effect of Cheonggukjang Pills Product Containing Blueberry and Aronia in Mouse Inflammatory Bowel Disease. *Korean J Food Nutr* 35: 513–520
 14. Ki-Hyo J, Min-Ah K, Ha Gyoon N, SangGuan Y, Ji-Eun K, Mi-Ja K (2022) Inhibitory Effects of Cheonggukjang Mucoicid on 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51: 1129–1135
 15. Lee SJ, Rim HK, Jung JY, An HJ, Shin JS, Cho CW, Rhee YK, Hong HD, Lee KT (2013) Immunostimulatory activity of polysaccharides from Cheonggukjang. *Food Chem Toxicol* 59: 476–484. doi: 10.1016/j.fct.2013.06.045
 16. Kim MJ, Kim JG, Sydara KM, Lee SW, Jung SK (2020) Croton hirtus L'Hér Extract Prevents Inflammation in RAW 264.7 Macrophages Via Inhibition of NF- κ B Signaling Pathway. *J Microbiol Biotechnol* 30: 490–496. doi: 10.4014/jmb.1908.08045
 17. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907–916. doi: 10.1038/ni1001-907
 18. Monmai C, Go SH, Shin IS, You S, Lee H, Kang S, Park WJ (2018) Immune Enhancement Effect of *Asterias amurensis* Fatty Acids through NF- κ B and MAPK Pathways on RAW 264.7 Cells. *J Microbiol Biotechnol* 28: 349–356. doi: 10.4014/jmb.1709.09005
 19. Lee JH, Ahn DU, Paik HD (2018) In Vitro Immune-Enhancing Activity of Ovotransferrin from Egg White via MAPK Signaling Pathways in RAW 264.7 Macrophages. *Korean J Food Sci Anim Resour* 38: 1226–1236. doi: 10.5851/kosfa.2018.e56
 20. MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323–350. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323
 21. Arias-Salvatierra D, Silbergeld EK, Acosta-Saavedra LC, Calderon-Aranda ES (2011) Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- κ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. *Cell Signal* 23: 425–435. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.10.017
 22. Zhao Y, Yang Y, Liu M, Qin X, Yu X, Zhao H, Li X, Li W (2022) COX-2 is required to mediate crosstalk of ROS-dependent activation of MAPK/NF- κ B signaling with pro-inflammatory response and defense-related NO enhancement during challenge of macrophage-like cell line with *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 16: e0010402. doi: 10.1371/journal.pntd.0010402
 23. Tavassolifar MJ, Vodjani M, Salehi Z, Izad M (2020) The Influence of Reactive Oxygen Species in the Immune System and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis* 2020: 5793817. doi: 10.1155/2020/5793817
 24. Wu F, Zhou C, Zhou D, Ou S, Liu Z, Huang H (2018) Immune-enhancing activities of chondroitin sulfate in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Carbohydr Polym* 198: 611–619. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.071
 25. Schooltink H, Rose-John S (2002) Cytokines as therapeutic drugs. *J Interferon Cytokine Res* 22: 505–516. doi:10.1089/10799900252981981
 26. Belardelli F, Ferrantini M (2002) Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* 23: 201–208. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02195-6
 27. Pradère JP, Hernandez C, Koppe C, Friedman RA, Luedde T, Schwabe RF (2016) Negative regulation of NF- κ B p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Sci Signal* 9: ra85. doi: 10.1126/scisignal.aab2820
 28. Zhang S, Li W, Smith CJ, Musa H (2015) Cereal-derived arabinoxylans as biological response modifiers: extraction, molecular features, and immune-stimulating properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55: 1035–1052. doi: 10.1080/10408398.2012.705188
 29. Shim J-Y, Jung I-s, Kim CW, Yun YS, Song J-Y (2004) Comparison between Immunostimulatory Activity and Molecular Structure of Different Polysaccharides. *Immune Network* 4: 94–99