

흑후추에서 분리한 글루칸형 다당류가 대식세포 자극 활성화에 미치는 영향

김다은 · 신현영* · 정원비 · 김효원 · 문수민 · 신광순** · †유광원***

국립한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, *고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템 융합전공 대학원생,
경기대학교 식품생물공학과 교수, *국립한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Effects of Glucan-type Polysaccharides from Black Pepper (*Piper nigrum*) on Macrophage Stimulating Activity

Da Eun Kim, Hyun Young Shin*, Won Bi Jeong, Hyo Won Kim,
Su Min Moon, Kwang-Soon Shin** and †Kwang-Won Yu***

Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea
*Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health Systems, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Korea
**Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea
***Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

To utilize pepper (*Piper nigrum*) as an immunostimulatory agent, we isolated macrophage stimulating polysaccharides from pepper and investigated their macrophage activating activities. Hot-water extracts (HW) of black pepper (BP) and white pepper (WP) were prepared, and their macrophage stimulating activities were evaluated using RAW 264.7 cells. BP-HW significantly promoted the secretion of macrophage stimulating factors such as nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, and IL-12 compared to WP-HW. When BP and WP-HW were fractionated into crude polysaccharides (CP) and low molecules (LM) by ethanol precipitation, BP-CP demonstrated significantly more potent activity. Furthermore, BP-CP not only induced mRNA gene expression of macrophage activation factors, but also promoted nuclear localization of p65 and c-Jun. In addition, component sugar analysis revealed that glucan-type polysaccharides in BP-CP played a crucial role in macrophage activation. Taken together, these findings suggest that black pepper has industrial applicability not only as a spice, but also as an immunostimulatory functional material.

Key words: *Piper nigrum*, black and white pepper, macrophage, crude polysaccharide, glucan

서 론

면역은 병원체나 외부 이물질에 대한 생체 내 방어 수단으로, 외부로부터 감염을 방어하는 데 특화된 세포와 분자로 이루어진 복잡한 조직망을 의미한다. 인간의 면역 체계는 주로 선천면역과 후천면역으로 구분되며, 선천면역은 비특이적이고 즉각적인 반응을 통해 인체의 방어 작용의 첫 번째 단계에서 병원체를 인식하고 제거하는 역할을 한다(Turvey

& Broide 2010). 이러한 반응은 호중구(neutrophils) 및 단핵구(monocytes)와 같은 식세포(phagocytes), 보체(complements) 및 사이토카인(cytokines)과 같은 다양한 요소들의 상호작용에 의해 이루어진다(Parkin & Cohen 2001). 이 중 대식세포(macrophages)는 대표적인 식세포로서 병원체를 탐식하여 제거하는 중요한 역할을 한다. 대식세포는 다양한 수용체를 통해 병원체를 인식하고 이에 대해 반응하며, 특히 패턴인식수용체(pattern recognition receptor; PRR)를 통해 병원체 관련 분

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

자 패턴(pathogen-associated molecular pattern; PAMP)을 감지한다(Akira 등 2001). PPR 중 하나인 톨 유사 수용체(toll-like receptor; TLR)에 항원이 결합하면 nuclear factor(NF)- κ B 및 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로가 활성화되어 산화질소(nitric oxide; NO)(Aktan F 2004), tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-6 및 IL-12와 같은 사이토카인의 발현을 촉진하고 다양한 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(Kawai & Akira 2007). 또한, 대식세포는 항원을 처리하고 제시하여 T 세포를 활성화하며(Guerrero JL 2019), 선천 면역과 후천 면역을 연결하는 중요한 매개체 역할을 하여(Navegantes 등 2017) 병원체를 효과적으로 제거하고 면역 체계를 유지한다.

한편, 향신료로 주로 이용되는 후추(*Piper nigrum*)는 인도 케랄라(Kerala)주의 말라바(Malabar) 지역을 원산지로 한 다년생 덩굴식물이다. 후추는 가공 방법에 따라 여러 이름으로 불리며, 후추 열매를 건조하면 흑후추, 후추의 껍질을 제거한 후 건조하면 백후추라 불리는 것으로 알려져 있다. 후추에는 알칼로이드 계열의 차비신(chavicine)과 피페린(piperine)과 같은 다양한 기능성 성분이 포함되어 있으며(Meghwal & Goswami 2013), 그 중 피페린이 가장 널리 알려진 성분 중 하나이다. 피페린은 후추의 매운맛을 내는 성분으로, 여러 연구에서 항염(Bang 등 2009), 항산화(Zarai 등 2013), 항종양(Yoo 등 2019), 항균(Shityakov 등 2019) 및 항바이러스 효과(Singh 등 2021)가 있음이 밝혀졌다. 또한, 피페린은 약물 투여에 대한 흡수율을 높여, 생체 이용률을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Shao 등 2015). 반면, 후추의 주요 성분 중 하나인 다당류(polysaccharides)는 생체 내에서 호흡기 관련 질환, 특히 기침을 완화하는 데 효과적이며, 호흡기 건강에 긍정적인 영향을 미친다고 보고된 바 있다(Khawas 등 2017). 또한, 후추로부터 분리된 다당류는 항당뇨 활성을 통해 당뇨 예방 및 관리에도 기여한다고 알려져 있다(Shamkuwar 등 2012). 최근에는 후추의 새로운 기능성 성분의 발견과 그 건강 증진 효과에 대한 지속적인 연구가 이루어지고 있으며(Jideani 등 2021), 이러한 연구는 후추가 향신료 뿐만 아니라, 다양한 질병 예방 및 생리활성 증대에 중요한 역할을 가질 수 있음을 시사한다. 그러나, 현재까지, 후추를 면역 자극 활성화 소재로 활용한 연구는 상대적으로 매우 부족한 실정이다.

본 연구에서는 후추를 면역 활성화 기능성 소재로서 활용하고자, 흑후추 및 백후추 열수추출물을 제조하고, 활성 성분을 분획하기 위해 조다당 획분과 저분자 획분으로 분리하였다. 이후 대식세포 활성을 평가하기 위하여 대식세포로부터 분리되는 대식세포 활성화인자 NO와 사이토카인 TNF- α , IL-6 및 IL-12의 생성량을 측정하고, 분자적 메커니즘을 확인함으로써 후추에서 분리한 다당류가 대식세포 활성화에 미치

는 영향을 확인하고자 하였다. 또한 구성당과 같은 화학적 조성을 분석하여 대식세포 활성 다당의 잠재적 가능성을 조사함으로써 후추의 면역 기능성 소재로서 개발 가능성을 제시하고, 향후 식품 및 의약품 산업에서의 활용 방안을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 열수추출물의 조제

본 연구의 흑후추(black pepper, BP)와 백후추(white pepper, WP)는 주식회사 오투기(Ottogi, Eumseong, Korea)에서 구입하였다. 흑후추(BP-HW) 및 백후추 열수추출물(WP-HW)은 원물 중량의 20배(w/v)의 증류수를 가하고 decoction 방법을 이용하여 얻었다(Shin 등 2022). 이후, 불용성 침전물을 제거하기 위해 원심분리(9,588 g, 20 min)하여 상등액을 회수하고 여과지(Adventec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과하였다. 여과액은 농축(Eyela, Tokyo, Japan) 및 동결건조(Ishin Biobase, Seoul, Korea)를 진행하여 흑후추 열수추출물(BP-HW; 11.7%)과 백후추 열수추출물(WP-HW; 8.2%)로 조제되었다(Fig. 1).

2. RAW 264.7 세포주의 배양 및 자극 활성화

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)에서 확보하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, MA, USA)과 1% penicillin/streptomycin(GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 대식세포 자극 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포주를 2.0×10⁶ cells/mL로 조정 한 후 96 well plate에 180 μ L씩 분주하여 배양기에서 3시간 배양하고 적당한 농도로 희석한 시료를 20 μ L 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 배양 후, 배양 상등액을 회수하여 대식세포 활성화 인자 NO와 TNF- α (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), IL-6(BD biosciences, San Diego, CA, USA) 및 IL-12(BD biosciences)를 측정하였다. NO의 함량은 Griess assay(Tursun 등 2016)의 방법을 이용하여 측정하였으며, TNF- α , IL-6 및 IL-12 함량은 각각의 제조사의 지침에 따라 sandwich ELISA 방법을 이용하여 분석하였다.

3. 열수추출물로부터 조다당 획분의 분획

흑후추 및 백후추로부터 조다당을 분획하기 위해 각각의 열수추출물을 소량의 증류수에 용해한 후 95% 주정을 첨가하여 최종 80% 농도로 조정 한 후 하루 동안 충분히 교반하였다. 이후 원심분리(9,588 g, 20 min)를 수행하고 침전물과 상등액을 분리하였다. 회수된 침전물은 다시 소량의 증류수에

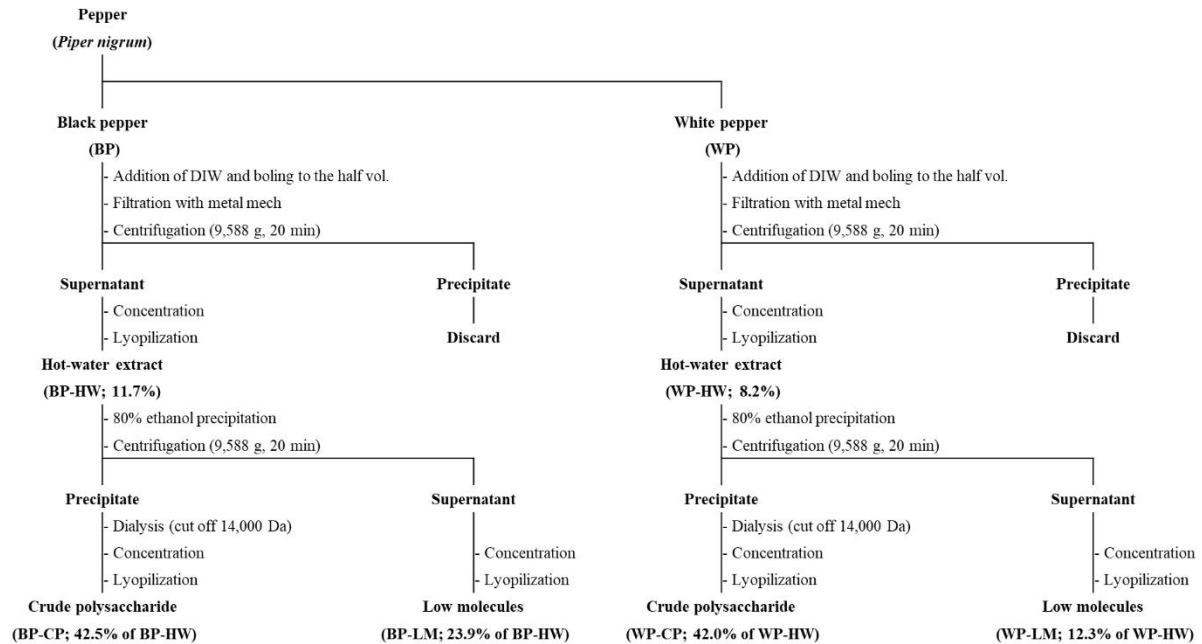


Fig. 1. Fractionation scheme of crude polysaccharides isolated from pepper.

용해하고 투석(molecular cut-off 12-14 kDa)을 거친 후 농축 및 동결건조하여 조다당 획분(crude polysaccharide; CP)으로 분획되었다. 반면, 상등액은 농축 및 동결건조하여 저분자 획분(low molecule; LM)으로 분획되었다. 이들의 수율은 각각 BP-CP(42.5% of BP-HW), BP-LM(23.9% of BP-HW), WP-CP(42.0% of WP-HW) 및 WP-LM(12.3% of WP-HW)로 확인되었다.

4. qRT-PCR을 이용한 mRNA 발현

RAW 264.7 세포주로부터 대식세포 자극 관련 인자의 mRNA 발현량을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 8.0×10^5 cells/mL로 하여 60 π dish에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양 상등액을 제거하고 시료를 적절한 농도로 serum-free DMEM에 희석하고 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 배양 후 상등액을 제거한 다음, phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하여 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 total RNA를 추출하였다. cDNA는 ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix Kit(Toyobo, Osaka, Japan)을 사용하여 합성하였다. mRNA 발현 분석은 SYBR Green PCR kit(Toyobo)를 이용하여 Quant Studio 3 real-time PCR system(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)을 통해 진행하였다. 각 유전자의 발현량은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 기준으로 보정하였으며, 각각의 primer 서열은 Table 1에 기재하였다.

5. 면역 형광법을 이용한 전사인자의 관찰

대식세포 내 nuclear factor(NF)- κ B(p65)와 activated protein(AP)-1의 전사인자 c-Jun의 핵 내 이동을 관찰하기 위해 면역형광법을 이용하였다. 12 mm cover slip을 24-well plate에 넣고 각 well에 0.1% gelatin을 500 μ L씩 분주한 후 30분간 방치하였다. 이후 여분의 상등액을 제거하고 RAW 264.7 세포주를 2.2×10^5 cells/mL로 조정하여 각 well에 900 μ L씩 분주하고 3시간 동안 배양하여 안정시켰다. 이후, 시료를 100 μ L씩 첨가하여 3시간 동안 재배양한 후 4% formaldehyde(Sigma Aldrich)를 가해 고정하였다. 각 well에 5% bovine serum albumin(BSA; in 0.1% Trion X-100; Sigma Aldrich/PBS)를 300 μ L씩 처리하여 암실에서 반응시키고, PBS를 이용해 세척 후 1차 항체(p65 및 c-Jun; Cell signaling, Denvers, MA, USA)를 처리하여 12시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체(Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG; Cell signaling)를 처리하여 암소에서 70분 동안 반응시키고 cover slip을 분리한 뒤 핵 염색을 위해 slide glass에 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 처리하고 광학현미경(IX73; Olympus, Waltham, MA, USA)을 이용하여 관찰하였다.

6. RP-HPLC를 이용한 구성당 분석

후추 조다당 획분의 구성당 분석은 reversed phase-high performance liquid chromatography-ultraviolet(RP-HPLC-UV; YL 9100, Young Lin, Gyeonggi, Korea) system을 사용하여

Table 1. Mouse primer sequences for qRT-PCR

Genes	Primer	Primer sequence (5'→3')	Accession number
<i>iNOS</i>	Forward	GGTGAAGGGACTGAGCTGTT	NM_010927.4
	Reverse	ACGTTCTCCGTTCTCTTGCAG	
<i>TNF-α</i>	Forward	CCCACGTCGTAGCAAACCA	NM_013693.3
	Reverse	CTTTGAGATCCATGCCGTTGG	
<i>IL-6</i>	Forward	TCACAGAGGATACCACTCCC	NM_031168.2
	Reverse	GAATTGCCATTGCACAACCTCTT	
<i>IL-12</i>	Forward	GAAGTCCAATGCAAAGGCGG	NM_001303244.1
	Reverse	TCCTAGGATCGGACCCTGC	
<i>GAPDH</i>	Forward	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC	NM_001289726.1
	Reverse	CCAATACGGCCAAATCCGTTC	

Honda 등(1989) 및 Shin 등(2021)의 방법으로 분석하였다. 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA; Sigma Aldrich)로 처리하여 aldose 단위로 분해하고 0.3 M NaOH와 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline(PMP; Sigma Aldrich)을 첨가하여 당당류와 PMP를 결합시켰다. 이후, 0.3 M HCl을 첨가하여 중화시킨 후 증류수와 chloroform으로 분리 및 추출하였고 물 층만 분리하여 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane filter(0.45 μm, Jaema Trade, Gangwon, Korea)로 여과하였다. 이후 YMC-Triart C18 column(250×4.6 mm, 5 μm, YMC, Kyoto, Japan)을 장착한 RP-HPLC-UV system으로 분석하였다. HPLC 분석 조건은 Table 2에 기재하였고, 시료 총 500 μg 중 당당류의 함량은 μg으로 나타내었으며, mole%는 peak area와 response factor를 이용하여 계산하였다.

7. 통계처리

각 실험은 3회 반복 수행되었으며, 결과는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. RAW 264.7 대식세포의 활성화 및 유전자 발현 분석은 SPSS V26(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 Student's *t*-test로 계산하였으며, 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 흑후추 및 백후추 열수추출물의 대식세포 활성화 비교

본 연구에서 사용된 RAW 264.7 세포는 마우스 유래 대식세포주로 면역 혹은 염증 반응을 매개하여 면역 기전 연구에 널리 이용된다(Mosser & Edwards 2008). 후추로부터 추출된 열수추출물의 대식세포 자극 활성을 평가하기 위하여 흑후추 열수추출물(BP-HW)과 백후추 열수추출물(WP-HW)을 RAW 264.7 세포에 처리 후, 대식세포 활성화 인자인 NO 및

Table 2. HPLC analysis conditions for the determination of component sugar

Analysis	Component sugar
HPLC system	YL 9100 series (YL Instrument, Anyang, Republic of Korea)
Column	YMC-Triart C18 (YMC, Kyoto, Japan)
Column size	250×4.6 mm, 5 μm
Column temperature	30°C
Flow rate	1.0 mL/min
Eluent	0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.7) : Acetonitrile 82:18
Injection volume	20 μL
Detector	YL 9120S UV/Vis detector (YL Instrument, Anyang, Republic of Korea)
Integrator	Autochro-3000

TNF-α, IL-6 및 IL-12의 생성능을 비교하였다. 먼저, 면역계에서 NO는 대식세포와 같은 면역 세포의 활성화를 유도하여 병원체를 제거하고, 사이토카인 생성을 촉진하여 면역반응을 조절하는 것으로 알려져 있다(Wink 등 2011). 대식세포에 양성 대조군으로 이용된 LPS와 함께 BP-HW와 WP-HW를 10~100 μg/mL의 농도로 처리하여 NO의 생성능을 평가한 결과(Fig. 2A), LPS는 음성대조군(NC) 대비 52.8 μM(약 14.9배 증가)의 생성능을 나타내었고, BP-HW는 10~100 μg/mL의 농도 범위에서 18.0~48.3 μM(약 5.1~13.6배 증가)의 생성능을 보인 반면, WP-HW는 50~100 μg/mL의 농도 범위에서 4.7~19.0 μM(약 1.3~5.4배 증가)의 NO 생성능을 나타내었다. 이러한 경향은 TNF-α, IL-6 및 IL-12 생성능에서도 확인되었으

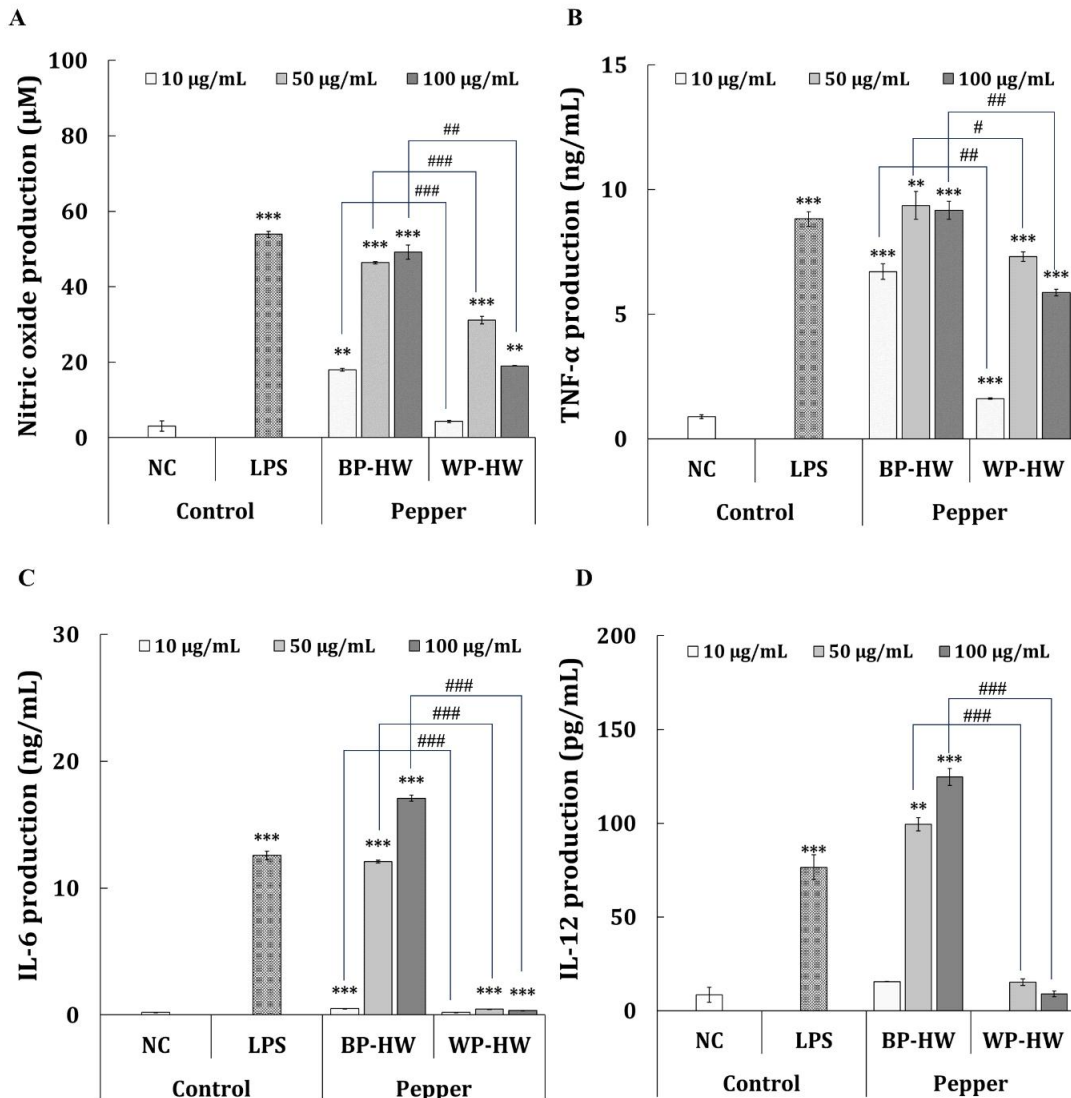


Fig. 2. Macrophage stimulatory activity of hot-water extract prepared from pepper. RAW 264.7 cells were treated with BP-HW and WP-HW for 24 h, and the production of nitric oxide (A), TNF- α (B), IL-6 (C), and IL-12 (D) was evaluated using the Griess assay and ELISA. Results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. The asterisks in the bar indicate significant differences between the negative controls (NC) and each test group, as determined by Student's *t*-test. Crosshatch patterns indicate significant differences between samples at the same concentration. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μ g/mL); BP-HW, hot-water extract of black pepper; WP-HW, hot-water extract of white pepper.

며(Fig. 2B, Fig. 2C 및 Fig. 2D), 모든 농도 범위에서 WP-HW에 비해 BP-HW가 유의하게 증가하였고, 특히 IL-12의 경우 WP-HW는 측정된 모든 농도 범위에서 통계적으로 유의한 생성능을 보이지 않았으나, BP-HW는 50~100 μ g/mL의 농도 범위에서 9.3~142.4 pg/mL(약 1.8~27.7배 증가)의 IL-12 생성능을 보였다. 따라서, 열수추출물의 대식세포 자극 활성 평가 결과, BP-HW(흑후추)는 WP-HW(백후추)보다 우수한 대식세

포 자극 활성을 확인할 수 있었다. 흑후추는 백후추에 비해 껍질을 포함하고 있으며, 후추의 껍질에는 피페린과 같은 생체 활성 물질이 다량 분포하여 면역세포의 기능을 촉진하는 것으로 알려져 있기 때문에(Sunila & Kuttan 2004), 흑후추 열수추출물이 백후추에 비해 대식세포 자극 활성의 증진에도 기여하는 것으로 추정되었다.

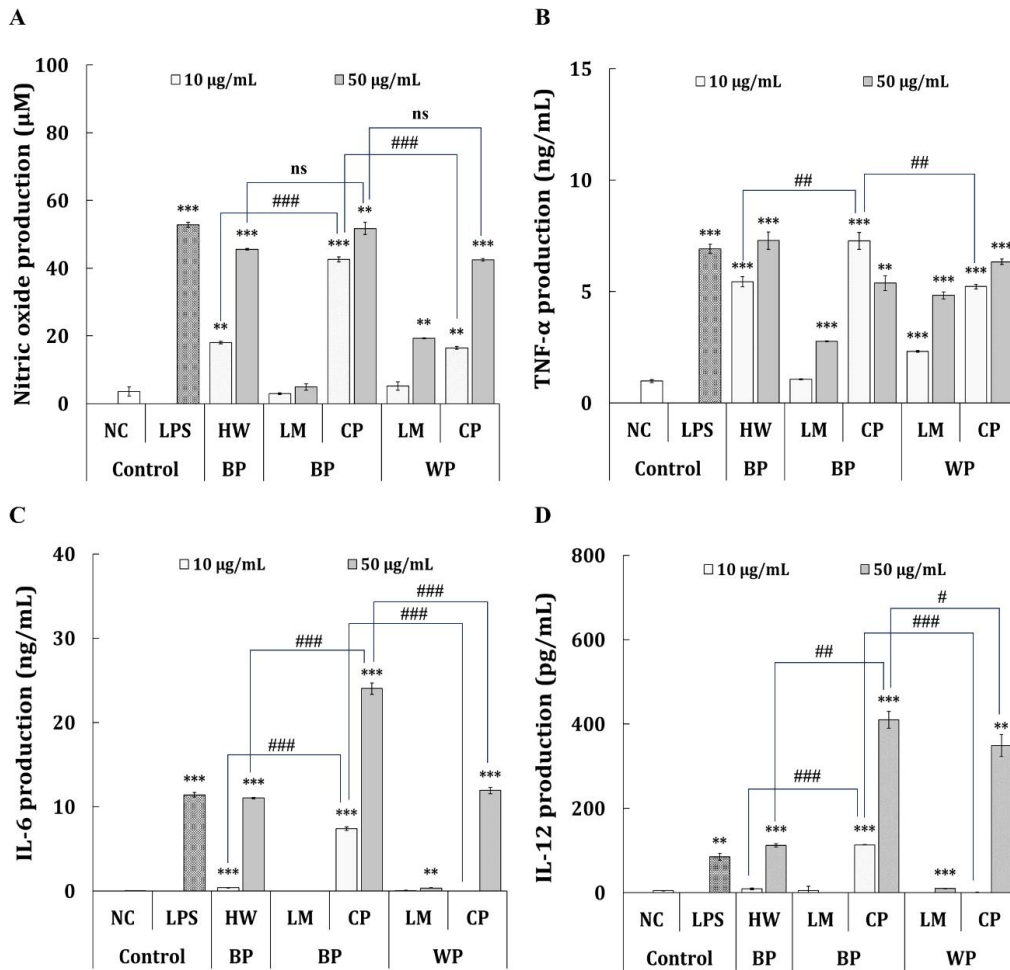


Fig. 3. Macrophage stimulatory activity of subfractions isolated from BP and WP-HW. RAW 264.7 cells were treated with subfractions isolated from BP and WP-HW for 24 h, and the production of nitric oxide (A), TNF- α (B), IL-6 (C), and IL-12 (D) was evaluated using the Griess assay and ELISA. Results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. The asterisks in the bar indicate significant differences between the negative controls (NC) and each test group, as determined by Student's *t*-test. Crosshatch patterns indicate significant differences between samples at the same concentration. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μ g/mL); BP, black pepper; WP, white pepper; HW, hot-water extract; LM, low molecule; CP, crude polysaccharide.

2. 흑후추 및 백후추 열수추출물로부터 분획된 하위 획분의 대식세포 활성 비교

일반적으로, 열수추출물에는 페놀 화합물과 플라보노이드 같은 저분자 물질(low molecule)과 다당류 혹은 단백 다당과 같은 고분자 물질이 혼재되어 있다고 알려져 있다(Kim 등 2024). 따라서, 후추 열수추출물의 대식세포 자극 활성에 관여하는 성분이 저분자 물질인지 혹은 고분자 물질인지를 확인하기 위해 주정 침전법(Shin 등 2021)으로 조다당 획분과 저분자 획분을 분획한 후 대식세포 자극 활성을 평가하였다. 먼저, NO 생성능의 경우(Fig. 3A), BP-CP는 10 및 50 μ g/mL의

농도에서 NC 대조군 대비 각각 42.6 및 51.7 μ M(약 12.0, 14.6 배 증가)의 생성능을 나타내었으며, 특히 10 μ g/mL의 농도에서 BP 및 WP 하위 획분에 비해 통계적으로 우수한 NO 생성능을 보였다. 한편, TNF- α 는 림프구 매개 반응을 통해 세포 사멸(apoptosis)을 유도하고, 면역 세포의 활성화를 촉진하여 면역 반응을 증진시키는 역할을 한다고 알려져 있는데(Li 등 2021), BP-CP는 10 μ g/mL의 농도에서 BP-HW를 포함한 모든 하위 획분(BP-LM, WP-LM 및 WP-CP)에 비해 통계적으로 우수한 TNF- α 생성능을 보였다(Fig. 3B). 또한, 이러한 경향은 Fig. 3C 및 Fig. 3D에 나타난 것처럼 IL-6 및 IL-12 생성능에

서도 확인할 수 있었는데, IL-6는 JAK2/STAT3 신호 전달 경로를 통해 면역 세포를 활성화하여 이들의 증식과 기능을 증진시키고 면역 반응을 조절할 수 있으며(Kang 등 2019), IL-12는 T 세포와 natural killer 세포를 활성화하여 면역반응을 강화할 뿐만 아니라 병원체에 대한 방어 작용을 증진시키는 중요한 역할을 한다(Zundler & Neurath 2015). 결론적으로, BP-HW로부터 분획된 BP-CP는 BP 저분자 및 WP의 모든획분에 비해 대식세포 활성화 관련 지표에서 우수한 활성을 나타내었으며, 이는 주정침전으로 분획된 고분자로서의 조다당획분이 대식세포 활성화에 관여하는 것으로 확인되었다.

3. 흑후추에서 분리된 조다당획분의 대식세포 활성화 인자의 유전자 발현량

흑후추 열수추출물로부터 분획된 조다당획분(BP-CP)에 의한 대식세포 활성화 기전을 분석하기 위해 qRT-PCR을 이용하여 앞서 분석한 대식세포 활성화 인자 NO, TNF- α , IL-6 및 IL-12의 mRNA 발현량을 분석하였다. 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase; iNOS)는 체내에서 NO 생성을 촉진하며, 생성된 NO는 병원체 제거 및 면역 세포가 감염된 세포를 공격하여 파괴하는 것을 돕는 것으로 알려져 있다(Xue 등 2018). 또한, iNOS의 유전자 발현은 면역 반응과 질병 상태에 따라 변화하며, 이는 면역 활성을 평가하는 데 중요한 지표가 된다(Zamora 등 2000). 먼저, BP-CP의 iNOS 유전자 발현량 결과(Fig. 4A) 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 약 132.6~2,246.5배의 mRNA 발현량 증가를 확인할 수 있었다. 또한, 동일 농도 범위에서 TNF- α 의 유전자 발현량 결과(Fig. 4B), BP-CP의 처리는 NC 대비 약 15.0~36.4배의 농도-의존적인 mRNA 발현을 유도하였다. IL-6 및 IL-12의 mRNA 발현량 분석 결과(Fig. 4C 및 Fig. 4D), 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 각각 약 163.2~21,587배 및 1.1~32.1배의 mRNA 유전자 발현량을 유도하였다. 이러한 결과로부터 BP-CP의 처리는 대식세포 활성화 관련 인자의 mRNA 발현을 유의하게 증가시켜, 세포 외로 분비되는 NO, TNF- α , IL-6 및 IL-12의 생성에 관여하는 것으로 확인되었다. 이는 iNOS의 유전자 발현이 NO 생산에 필수적이며, NO가 병원체를 제거하고 감염된 세포를 파괴하는 면역 방어 역할을 한다는 기존 연구들과 일치하며(Connelly 등 2003; Xue 등 2018), 기존 연구에서 확인된 바와 같이(Tanaka 등 2014; El-Tahan 등 2016), BP-CP에 의해 TNF- α , IL-6 및 IL-12의 유전자 발현을 통해 관련 인자의 생성을 촉진하고 면역 활성에 관여할 수 있음을 나타낸다.

4. 흑후추에서 분리된 조다당획분에 의한 p65 및 c-Jun의 핵 내 국소화

BP-CP 처리에 따른 주요 대식세포 활성화 기전을 확인하

기 위해, BP-CP가 NF- κB 및 MAPK 신호전달 경로에 미치는 영향을 조사하였다. NF- κB 와 MAPK 경로는 대식세포 활성화에 중추적인 역할을 하는 메커니즘 중 하나로 알려져 있다(Dev 등 2011). 특히, NF- κB 신호전달 경로는 p65 단백질의 인산화를 유도하여 I κ B α 단백질의 인산화 및 분해를 촉진하며, 이로 인해 인산화된 p65는 핵으로 이동하여 면역 활성화에 관여하는 유전자들의 전사를 촉진한다(Perkins ND 2007). 또한, 대식세포가 자극을 받아 MAPK 경로가 활성화되면 c-Jun이 인산화되어 activator protein(AP)-1 복합체를 형성하고, 이 복합체는 핵으로 이동하여 대식세포 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 바 있다(Casals-Casas 등 2009). 한편, 면역형광법은 특정 단백질이나 구조물에 대한 형광 표지 항체를 사용하여 세포 내 위치를 시각적으로 확인할 수 있어, 세포의 세부적인 기능적 변화를 관찰하고 단백질의 이동 경로를 분석할 수 있는 유용한 방법으로 알려져 있다(Donaldson JG 2015). 이를 활용하여, RAW 264.7 세포에 BP-CP를 처리하고 p65 및 c-Jun의 핵 내 국소화 여부를 관찰하였다(Fig. 5). 먼저, NC 대조군의 경우, FITC로 표지된 p65 및 c-Jun이 핵 내로 국소화가 진행되지 않아, merge 시 붉은색의 형태를 보였으며, LPS 처리군은 p65 및 c-Jun이 핵 내로 국소화되어 세포의 형태가 초록색(merge 시)의 형태를 보이는 것으로 확인되었다. 이와 유사하게, BP-CP 처리에 의해 FITC로 표지된 p65 및 c-Jun의 핵 내 국소화가 진행되어, 세포가 주로 초록색의 형태를 보였다. 이러한 결과는 BP-CP가 NF- κB 및 MAPK 경로의 활성화를 통해 대식세포의 면역 활성화에 관여하는 것으로 확인되었다.

5. 흑후추에서 분리된 조다당획분의 구성당 분포

본 연구에서는 BP-CP의 구성당 분포를 분석하여 대식세포 활성화에 관여하는 활성 성분을 확인하고자 하였다. HPLC 크로마토그램은 Fig. 6에 나타냈으며, 분석 결과는 Table 3에 나타냈다. BP-CP의 주요 구성당은 glucose(Glc)로 확인되었으며, 전체 500 μg 의 성분 중 Glc는 450.9 μg 을 차지하여 95.6%에 해당하는 것으로 확인되었다. 그 외에도 galactose 6.0 μg (1.2%) 및 arabinose 5.1 μg (1.0%)가 검출되어, BP-CP는 주로 Glc로 구성된 glucan-type의 다당류로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. Glucan-type 다당류는 면역계에서 중요한 생리활성을 나타내는 물질로 널리 알려져 있으며(Schepetkin & Quinn 2006), 일반적으로 α 및 β -type의 glucan으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다. α -glucan은 식물체에서 주로 전분과 같은 형태로 흔히 발견되는 저장성 다당류로 α -1,4 글리코사이드 결합으로 이루어진 포도당 중합체를 의미한다(Damager 등 2010). 반면, β -glucan은 버섯, 효모, 곡류 및 세포벽에서 주로 발견되며(Brown & Gordon 2003), 면

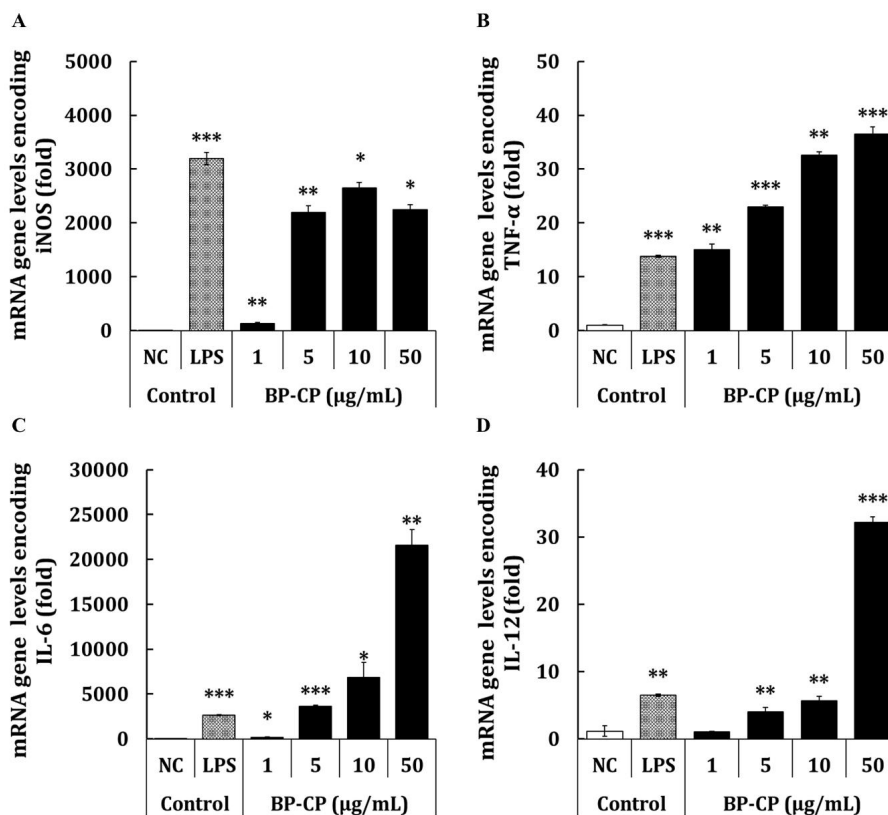


Fig. 4. Effects of BP-CP on the mRNA expression levels of genes encoding macrophage stimulating factors in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with BP-CP for 24 h, and the mRNA expression levels of iNOS (A), TNF- α (B), IL-6 (C), and IL-12 (D) were evaluated using qRT-PCR. Results are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. The asterisks in the bar indicate significant differences between the negative controls (NC) and each test group, as determined by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μ g/mL); BP-CP, crude polysaccharide isolated from BP-HW.

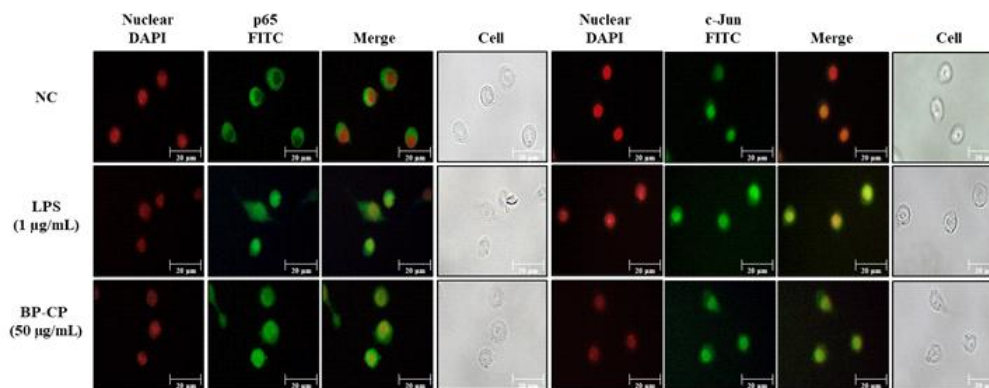


Fig. 5. Effect of BP-CP on the nuclear localization of activated p65 and c-Jun in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were seeded onto 0.1% gelatin-coated coverslips and then treated with BP-CP for 3 h. RAW 264.7 cells were fixed and immunostained with FITC-conjugated anti-p65 and anti-c-Jun antibodies, and the nuclei were counterstained with DAPI. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μ g/mL); BP-CP, crude polysaccharide isolated from BP-HW.

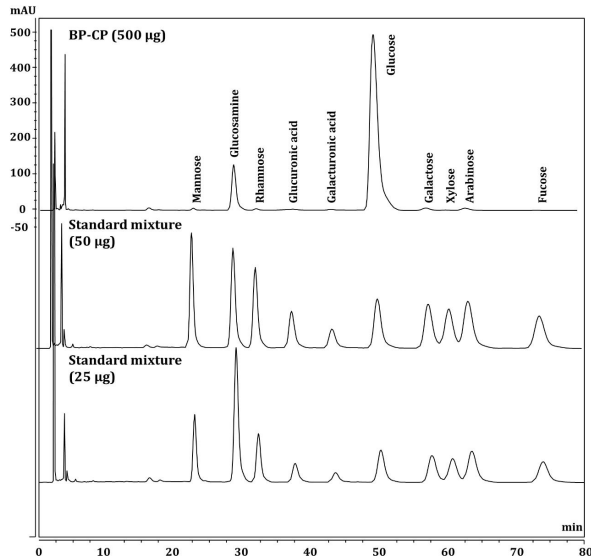


Fig. 6. HPLC chromatogram for measuring the component sugar of BP-CP.

역 조절에 중요한 역할을 가지며, 면역세포의 표면 수용체 (dectin-1 및 complement receptor 3 등)와 결합하여 면역반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Huang 등 2015). 이에 따라, 후속 연구에서는 BP-CP의 추가적인 분리 및 정제 공정을 통해 후추로부터 분리된 활성 다당을 분리하고 여러 화학 분석 기법을 통해 후추 유래 glucan의 정확한 구조를 규명하고자 하며, 대식세포 활성화에 기여하는 구체적인 메커니즘을 제시하고자 한다.

요약 및 결론

본 연구에서는 후추(*Piper nigrum*)를 면역 자극제로 활용하기 위해 후추로부터 대식세포 자극 활성 다당류를 분리하여 대식세포 활성화를 조사했다. 흑후추(BP) 및 백후추(WP)의 열수추출물(HW)을 준비하고, RAW 264.7 세포를 이용하여 대식세포 자극 활성을 평가하였다. BP-HW는 WP-HW에 비해 NO, TNF- α , IL-6 및 IL-12와 같은 대식세포 자극 인자의 분비를 유의적으로 촉진했다. 더 나아가, 주정 침전을 사용하여 BP 및 WP-HW로부터 조다당 획분(CP)과 저분자 획분(LM)으로 분획하였을 때, BP-CP가 유의적으로 우수한 대식세포 자극 활성을 보였다. 또한, BP-CP는 대식세포 활성화 인자의 mRNA 유전자 발현을 유도할 뿐만 아니라 p65 및 c-Jun의 핵 내 국소화를 촉진하였다. 구성당 분석 결과, BP-CP의 글루칸형 다당류가 대식세포 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과를 종합하면, 후추는 향신료 뿐만 아니라 면역 자극 기능성 소재로서의 산업

Table 3. Component sugars of BP-CP isolated from BP-HW

Monosaccharide	BP-CP (500 μ g)	
	Value (μ g)	Mol %
Mannose	2.8 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0
Rhamnose	2.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0
Glucuronic acid	5.0 \pm 0.7	0.7 \pm 0.1
Galacturonic acid	5.9 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0
Glucose	450.9 \pm 0.4	95.6 \pm 0.1
Galactose	6.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0
Xylose	-	-
Arabinose	5.1 \pm 0.2	1.0 \pm 0.0
Fucose	-	-
Total (%)	95.7	100.0

적 활용 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

본 논문은 2024년 국립한국교통대학교 지원을 받아 수행하였음.

References

- Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-680
- Aktan F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75:639-653
- Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, Yang HI, Yoo MC, Hahm DH, Kim KS. 2009. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther* 11:R49
- Brown GD, Gordon S. 2003. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19:311-315
- Casals-Casas C, Álvarez E, Serra M, de la Torre C, Farrera C, Sánchez-Tilló E, Caelles C, Lloberas J, Celada A. 2009. CREB and AP-1 activation regulates MKP-1 induction by LPS or M-CSF and their kinetics correlate with macrophage activation versus proliferation. *Eur J Immunol* 39:1902-1913
- Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. 2003. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase

- autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem* 278:26480-26487
- Damager I, Engelsens SB, Blennow A, Møller BL, Motawia MS. 2010. First principles insight into the α -glucan structures of starch: Their synthesis, conformation, and hydration. *Chem Rev* 110:2049-2080
- Dev A, Iyer S, Razani B, Cheng G. 2011. NF- κ B and innate immunity. In Karin M (Ed.), *NF- κ B in Health and Disease*. pp.115-143. Springer
- Donaldson JG. 2015. Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Cell Biol* 69:4.3.1-4.3.7
- El-Tahan RR, Ghoneim AM, El-Mashad N. 2016. TNF- α gene polymorphisms and expression. *SpringerPlus* 5:1508
- Guerriero JL. 2019. Macrophages: Their untold story in T cell activation and function. *Int Rev Cell Mol Biol* 342:73-93
- 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 JH, Lin CY, Wu SY, Chen WY, Chu CL, Brown GD, Chuu CP, Wu-Hsieh BA. 2015. CR3 and dectin-1 collaborate in macrophage cytokine response through association on lipid rafts and activation of Syk-JNK-AP-1 pathway. *PLOS Pathog* 11:e1004985
- Jideani AI, Silungwe H, Takalani T, Omolola AO, Udeh HO, Anyasi TA. 2021. Antioxidant-rich natural fruit and vegetable products and human health. *Int J Food Prop* 24:41-67
- Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2019. Targeting interleukin-6 signaling in clinic. *Immunity* 50:1007-1023
- Kawai T, Akira S. 2007. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469
- Khawas S, Nosál'ová G, Majee SK, Ghosh K, Raja W, Sivová V, Ray B. 2017. *In vivo* cough suppressive activity of pectic polysaccharide with arabinogalactan type II side chains of *Piper nigrum* fruits and its synergistic effect with piperine. *Int J Biol Macromol* 99:335-342
- Kim YS, Shin HY, Jeong WB, Ha E, Koo JP, Shin JY, Yu KW. 2024. Effect of *Astragalus membranaceus*-postbiotics polysaccharide changed by lactic acid bacteria on macrophage. *Korean J Food Nutr* 37:17-29
- Li K, Qiu H, Yan J, Shen X, Wei X, Duan M, Yang J. 2021. The involvement of TNF- α and TNF- β as proinflammatory cytokines in lymphocyte-mediated adaptive immunity of Nile tilapia by initiating apoptosis. *Dev Comp Immunol* 115:103884
- Meghwal M, Goswami T. 2013. *Piper nigrum* and piperine: an update. *Phytother Res* 27:1121-1130
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969
- Navegantes KC, de Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. 2017. Immune modulation of some autoimmune diseases: The critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *J Transl Med* 15:36
- Parkin J, Cohen B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777-1789
- Perkins ND. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:49-62
- Schepetkin IA, Quinn MT. 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 6:317-333
- Shamkuwar PB, Shahi SR, Jadhav ST. 2012. Evaluation of antidiarrhoeal effect of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Asian J Plant Sci Res* 2:48-53
- Shao B, Cui C, Ji H, Tang J, Wang Z, Liu H, Qin M, Li X, Wu L. 2015. Enhanced oral bioavailability of piperine by self-emulsifying drug delivery systems: *In vitro*, *in vivo* and *in situ* intestinal permeability studies. *Drug Deliv* 22:740-747
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Yu KW. 2022. Macrophage stimulating activity of crude polysaccharide on maca (*Lepidium meyenii*) varieties. *Korean J Food Nutr* 35:7-15
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Sci Technol* 34:36-46
- Shityakov S, Bigdelian E, Hussein AA, Hussain MB, Tripathi YC, Khan MU, Shariati MA. 2019. Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. *Eur J Med Chem* 176:149-161
- Singh NA, Kumar P, Jyoti, Kumar N. 2021. Spices and herbs: Potential antiviral preventives and immunity boosters during COVID-19. *Phytother Res* 35:2745-2757
- Sunila ES, Kuttan G. 2004. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol* 90:339-346

- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016295
- Tursun X, Zhao Y, Talat Z, Xin X, Tursun A, Abdulla R, AkberAisa H. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Biomol Ther* 24:184-190
- Turvey SE, Broide DH. 2010. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125:S24-S32
- Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 89:873-891
- Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. 2018. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. *Int J Mol Sci* 19:3805
- Yoo ES, Choo GS, Kim SH, Woo JS, Kim HJ, Park YS, Kim BS, Kim SK, Park BK, Cho SD, Nam JS, Choi CS, Che JH, Jung JY. 2019. Antitumor and apoptosis-inducing effects of piperine on human melanoma cells. *Anticancer Res* 39:1883-1892
- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6:347-373
- Zarai Z, Boujelbene E, Salem NB, Gargouri Y, Sayari A. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT Food Sci Technol* 50:634-641
- Zundler S, Neurath MF. 2015. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:559-568

Received 14 September, 2024

Revised 02 October, 2024

Accepted 10 October, 2024