



The immune enhancing effect of *Cirsium japonicum* var. *maackii*-derived flavone components in IFN- γ -induced RAW264.7 macrophage cells

Byeong Wook Noh¹ · Ji Myung Choi^{2,3} · Sanghyun Lee^{4,5} · Ji-Hyun Kim¹ · Eun Ju Cho¹

IFN- γ 로 유도한 RAW264.7 대식세포에서 영경취(*Cirsium japonicum* var. *maackii*) 유래 flavone 성분들의 면역증진 효과

노병욱¹ · 최지명^{2,3} · 이상현^{4,5} · 김지현¹ · 조은주¹

Received: 8 January 2024 / Accepted: 6 February 2024 / Published Online: 22 February 2024

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2024

Abstract As the incidence of infectious diseases rapidly increases, interest in immunomodulators is increasing. Immunomodulators refer to natural molecules and biologically synthesized substances that have the ability to regulate the immune response of the innate and adaptive immune systems. *Cirsium japonicum* var. *maackii* (CJM) has been reported to have anti-oxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory effects. Notably, considering recent findings of tumor suppressive effect, CJM is expected to be effective in improving the immune system. In this present study, we

confirmed immune-enhancing activity of flavone (i.e. cirsimarin, cirsimaritin, pectolinarin, pectolinarigenin, hispidulin) derived from CJM on interferon-gamma-induced RAW264.7 macrophages. In ELISA analysis, the expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the cirsimarin and cirsimaritin groups was significantly increased compared to the normal group. In western blot analysis, the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in the cirsimarin and cirsimaritin groups was significantly increased compared to the normal group. Taken together, cirsimarin and cirsimaritin showed an immune enhancement effect by increasing cytokines and proteins related to the immune-boosting. Therefore, among flavones derived from CJM, cirsimarin and cirsimaritin are considered to be able to be used as functional food materials that are effective in enhancing immunity.

Keywords *Cirsium japonicum* var. *maackii* · Cytokine · Flavones · Functional food · Immune-enhancing activity · Macrophages

Ji-Hyun Kim (✉)
E-mail: llissunll@gmail.com

Eun Ju Cho (✉)
E-mail: ejcho@pusan.ac.kr

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea

²Department of Food and Nutrition, Kyungsung University, Busan 48434, Republic of Korea

³Department of Food Science and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Republic of Korea

⁴Department of Plant Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

⁵Natural Product Institute of Science and Technology, Anseong 17546, 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.

서론

COVID-19 팬데믹으로 인해 전 세계적으로 면역력 강화에 대한 관심이 크게 높아짐에 따라 의약품 및 천연물을 활용한 면역력 강화 기능성 식품에 대한 수요가 증가하고 있다[1]. 면역 반응은 미생물, 바이러스, 박테리아, 암세포 및 기타 외부 요인으로부터 몸을 방어하여 다양한 감염병과 질병으로부터 보호하는 핵심적인 생물학적 방어체계이다[2]. 면역 시스템은 크게 선

천성 면역과 후천성 면역으로 구분할 수 있다[3]. 선천성 면역은 선천적으로 가지고 있는 기본적인 면역 시스템으로 병원체와 유해물질을 빠르게 탐지하여 제거하는 반응이다[4]. 후천성 면역은 병원체에 대한 특정 항체와 메모리를 형성하여 면역 기억 기능을 수행함으로써 우리 몸을 방어하는 반응이다[5].

면역조절제는 면역증강제, 면역보조제, 면역억제제의 세 가지로 구분되며, 이 중 면역증강제는 다양한 작용 방식으로 면역체계의 효능을 향상시키는 물질을 말하고, 면역보조제는 특정 백신과 함께 사용 시에 면역 반응을 향상시키는 물질을 말한다[6]. 반면에 면역억제제는 면역 체계의 활성을 감소시키는 물질을 의미한다[7]. 현재 Bacille Calmette-Guerin, levamisole 등 면역세포에 작용하여 특정한 면역 반응을 강화시키는 면역조절제들이 많이 개발되어 있지만, 이러한 합성 약물들의 사용 시 구토, 복통 등의 부작용이 나타날 수 있으며, 장기간 사용 시 예상치 못한 부작용까지 초래할 수 있다[8-10]. 이러한 약물 부작용의 발생을 막기 위해 더 효과적이고 안전한 접근법을 모색할 필요가 있다. 약용 식물은 활성 성분의 존재로 인해 다중 약리학적 효능을 가지며, 이에 따라 임상 치료제의 필수 공급원으로 사용되고 있다[11]. 최근 *in vivo* 및 *in vitro* 연구에서 quercetin, ellagic acid와 같은 식물유래 천연물질의 투여는 면역조절 활성을 통해 면역 관련 질병의 발생을 크게 감소시킨 것으로 보고되었다[12-15].

영경귀(*Cirsium japonicum* var. *maackii*)는 국화과에 속하는 다년생 식물로, 예로부터 한방에서 염증, 고혈압, 혈뇨 등의 치료에 사용되어왔다[16]. 이전 연구에서 항산화, 항염증 등의 생리활성이 확인되었으며, 특히 최근 연구에서 영경귀 추출물은 RAW264.7 대식세포에서 NO 생산 증가 및 NF- κ B 신호전달 경로의 유도를 통해 면역증진에 관한 효능을 나타냈다[17,18].

영경귀의 대표적인 활성물질로는 cirsimarín, cirsimaritin, pectolarín, pectolarinigenin, hispidulin 등의 flavonoid류가 확인되어 보고되었다[19-21]. 그러나 이들 flavonoid류의 면역증강 효과에 대한 연구는 없으며, 따라서 본 연구는 영경귀에 많이 함유되어 있는 것으로 보고된 flavonoid류인 cirsimarín, cirsimaritin, pectolarín, pectolarinigenin, hispidulin의 면역력 강화에 관한 효능을 확인하였다.

대식세포는 선천성 및 후천성 면역 반응에 모두 관여하여 우리 몸을 외부 병원체 및 유해물질로부터 보호하는데, 항원 자극에 의해 활성화되어 산화질소 및 다양한 cytokine의 분비를 증가시키고 체내 유해세균의 증식을 억제하는 등 면역 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[22-25]. 면역 메커니즘을 연구하기 위해 mouse 대식세포인 RAW264.7 세포가 일반적으로 사용되고 있다[26].

따라서 본 연구에서는 RAW264.7 대식세포를 활용하여 영경귀 유래 천연성분들 중 플라본 계열에 속하는 cirsimarín, cirsimaritin, pectolarín, pectolarinigenin, hispidulin의 세포 생존율 및 cytokine의 생성과 분비에 미치는 영향을 확인하고, 염증성 인자의 단백질 발현 수준을 측정하여 면역자극 활성을 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 항체

Cirsimarín, cirsimaritin, hispidulin은 Natural Product Institute of Science and Technology (Anseong, Korea)에서 구매하였다. Pectolarín은 Chemfaces (Wuhan, Hubei, China)에서, pectola-

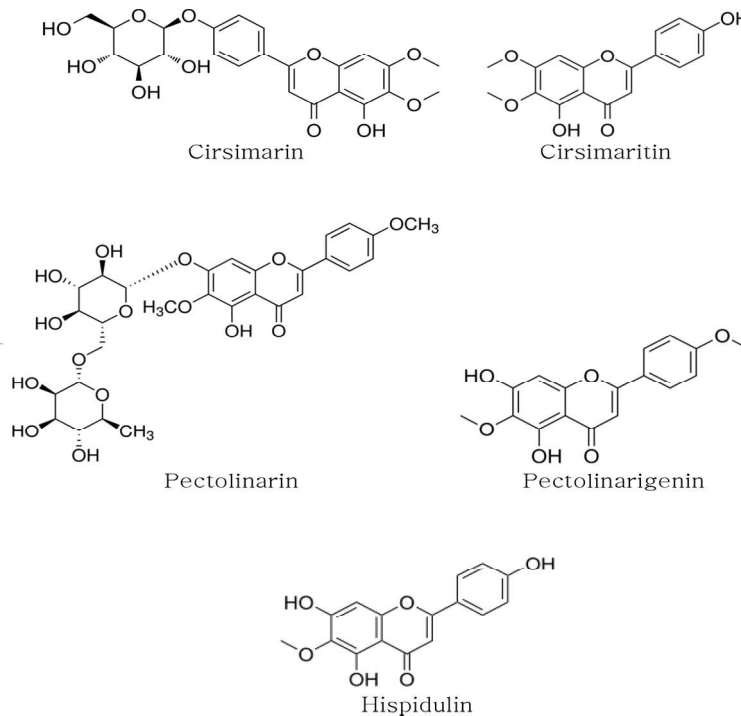


Fig. 1 Chemical structures of flavonoides derived from CJM

ringenin은 Sigma (Saint Louis, MO, USA)에서, interferon-gamma (IFN- γ)는 Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA)에서 구매하였다. 이들 flavone들의 구조는 Fig. 1과 같다. 또한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)는 Bio Basic (Markham, Ontario, Canada)에서, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicilin-streptomycin은 Welgene (Deagu, Korea)에서 구매하였고, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였다. 그리고 protein assay dye, 2x laemmli sample buffer는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서, protease inhibitor cocktail, polycylnidene fluoride (PVDF) membranes, enhanced chemiluminescence (ECL)는 Merck Millipore Co. (Burlington, VT, USA)에서, radioimmunoprecipitation assay buffer는 iNtRON Bio. (Seongnam, Korea)에서 구매하였다. 2-mercaptoethanol은 Biopure Co. (Cambridge, MA, USA)로부터, sodium dodecyl sulfate (SDS)는 ThermoFisher scientific Co. (Waltham, MA, USA)로부터, protein marker는 GenDEPOT Co. (Katy, TX, USA)로부터 구매하였다. Western blot 실험에 사용하기 위해 b-actin, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 1차 항체와 anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody 2차 항체는 Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA)로부터 구매하였다.

세포 배양

RAW264.7 대식세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. RAW264.7 대식세포는 10% FBS와 1%의 penicillin-streptomycin을 함유한 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 배양된 세포는 세포 밀도가 80~90%에 도달했을 때 flask로부터 떼어낸 후 원심분리하여 계대배양하였다.

Cell viability 측정

RAW264.7 대식세포의 세포 생존율은 MTT 분석을 사용하여 평가되었다. 세포를 1×10⁴ (cell/well)의 농도로 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 24시간 후 IFN- γ 를 처리하였고, 2시간 후 cirsimarin, cirsimaritin, pectolinarin, pectolinarigenin, hispidulin을 각각 1, 2.5, 5 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 MTT solution을 200 μ L씩 분주하여 4시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 각 well에 생성된 formazan을 녹이기 위해 DMSO 200 μ L를 넣은 후 30분 배양하고 microplate reader (LTEK, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytokine 생성량 측정

RAW264.7 대식세포를 24 well plate에 1×10⁵ (cell/well) 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였다. 24시간 후 IFN- γ 를 처리하였고 2시간 후 cirsimarin, cirsimaritin, pectolinarin, pectolinarigenin, hispidulin을 1 μ g/mL 농도로 처리하였다. 6, 24시간 후 상층액을 추출했으며 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin (IL)-6의 방출은 제조사의 설명에 따라 ELISA kit (R&D Systems)를 사용하여 분석하였다.

Western blot 분석

RAW264.7 대식세포를 1×10⁶ (cell/well) 농도로 6 well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였다. 24시간 후 IFN- γ 를 세포에 처리하였고 2시간 후 cirsimarin, cirsimaritin을 0.1, 0.5, 1 μ g/mL의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 수집하고 lysis buffer에 용해시킨 후 4°C에서 20분간 12,000 rpm으로 원심분리하였고 단백질 농도는 Bradford assay에 의해 결정하였다[27]. 동일한 양의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에 로딩한 다음 PVDF membrane으로 옮기고, membrane을 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양하였다. membrane을 PBST로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체와 함께 1시간 동안 배양하였다. 이후 membrane에 ECL 용액을 처리하여 단백질 발현 정도를 측정하였다. 단백질 band는 chemiluminescent imaging system (Davinch chemiTM, Seoul, Korea)을 사용하여 검출하였고 ImageJ 소프트웨어(v1.53, NIH, Bethesda, MD, USA)로 정량화하였다.

통계 분석

모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 데이터는 SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석되었다. Duncan's multiple test를 기반으로 한 one-way analysis of variance (ANOVA)를 사용하여 그룹 간 통계적 차이를 확인하였고, $p < 0.05$ 일 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

영경귀 유래 flavones의 RAW264.7 대식세포에 대한 세포독성 확인

Cirsimarin, cirsimaritin, pectolinarin, pectolinarigenin, hispidulin의 세포 독성을 조사하기 위해 MTT assay를 실시하였다(Fig. 2). IFN- γ 를 처리한 control군에서 세포 생존율이 normal군에 비해 151.36%까지 증가한 것으로 보아, IFN- γ 의 자극에 의해 대식세포가 활성화된 것으로 보인다. Cirsimarin, cirsimaritin, hispidulin을 처리한 군에서는 5 μ g/mL까지 세포 생존율에 미치는 영향이 발견되지 않았다. Cirsimaritin을 처리한 군에서는 농도가 증가함에 따라 생존율이 현저히 감소하는 경향을 보였으며, 5 μ g/mL로 처리한 군에서 normal군에 비해 유의적으로 감소하며 세포 독성이 있는 것으로 확인되었다. 이에 따라 이후 실험은 1 μ g/mL 이하의 농도에서 수행되었다.

영경귀 유래 flavones의 RAW264.7 대식세포에 대한 cytokine 생성량 확인

IFN- γ 로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 영경귀 유래 천연물 질들의 면역증진 효과를 확인하기 위해 TNF- α 와 IL-6의 생성량을 측정했다(Fig. 3). IFN- γ 를 처리한 control군에서 normal군에 비해 TNF- α 의 수준이 유의적으로 증가했다. IFN- γ 로 유도된 RAW264.7 대식세포에 cirsimarin과 cirsimaritin을 처리하였을 때 control군에 비해 TNF- α 의 수준이 유의적으로 증가했다. 또한 IL-6의 수준은 control군에서 normal군에 비해 유의하게 증가하지 않았으나 cirsimarin과 cirsimaritin을 처리한 군에서 normal군에 비해 IL-6의 수준이 유의하게 증가하였다. Pectolinarin,

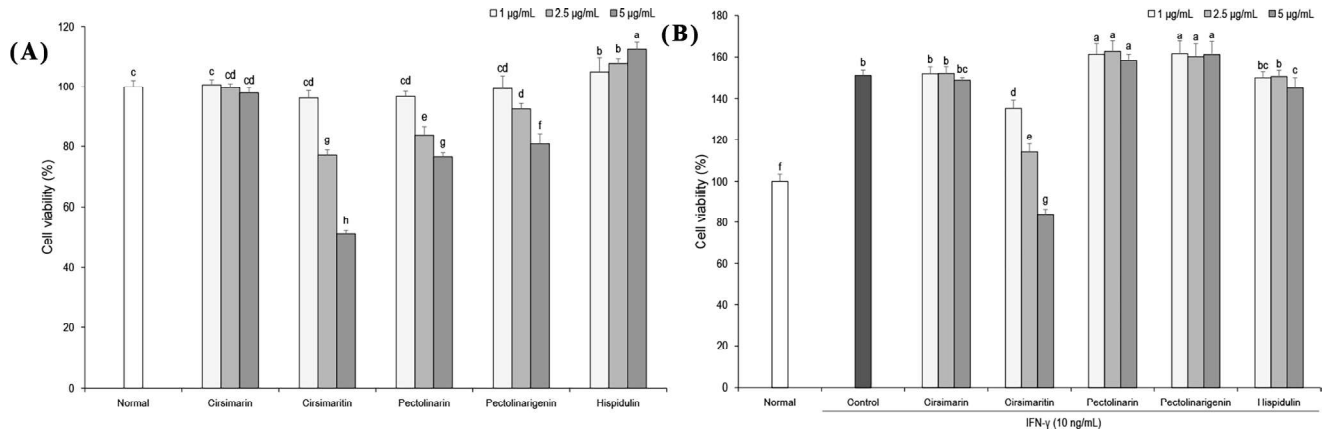


Fig. 2 Effects of cirsimar, cirsimaritin, pectolarin, pectolarinigenin, and hispidulin on cell viability in RAW264.7 cells. (A) RAW264.7 cells were treated with cirsimar, cirsimaritin, pectolarin, pectolarinigenin, and hispidulin (1, 2.5, and 5 µg/mL). (B) RAW264.7 cells were induced with IFN-γ (10 ng/mL) followed by stimulation with cirsimar, cirsimaritin, pectolarin, pectolarinigenin, and hispidulin (1, 2.5, and 5 µg/mL). The results were expressed as mean ± SD. The different letters (a-h) among groups represent significant differences by Duncan’s multiple range ($p < 0.05$)

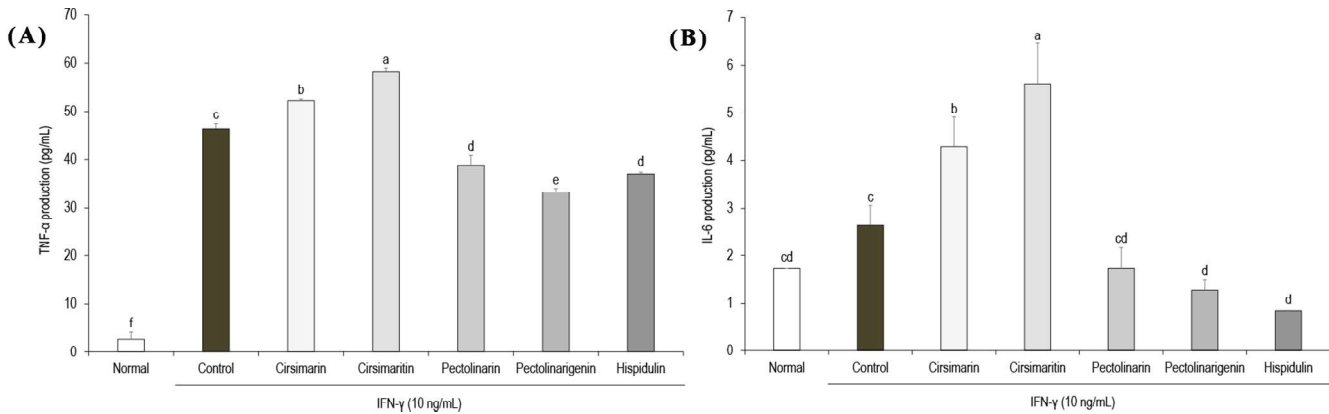


Fig. 3 Effects of cirsimar, cirsimaritin, pectolarin, pectolarinigenin, and hispidulin on TNF-α (A) and IL-6 (B) productions in IFN-γ-induced RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were induced with IFN-γ (10 ng/mL) followed by stimulation with cirsimar, cirsimaritin, pectolarin, pectolarinigenin, and hispidulin (1 µg/mL). The results were expressed as mean ± SD. The different letters (a-f) among groups represent significant differences by Duncan’s multiple range ($p < 0.05$)

pectolarinigenin, hispidulin군에서는 TNF-α와 IL-6 수준이 control군에 비해 유의적으로 증가하지 않았다.

Cirsimar과 cirsimaritin의 RAW264.7 대식세포에 대한 염증성 인자 발현 확인

IFN-γ로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 염증성 인자에 대한 cirsimar과 cirsimaritin의 효과를 확인하기 위해 COX-2와 iNOS의 발현을 측정했다(Fig. 4, 5). COX-2의 발현은 cirsimar을 0.1, 0.5, 1 µg/mL 농도로 처리한 군에서 control군에 비해 유의하게 증가했고, cirsimaritin을 0.5, 1 µg/mL 농도로 처리한 군에서 control군에 비해 유의하게 증가했다. iNOS의 발현은 cirsimar을 0.5, 1 µg/mL 농도로 처리한 군에서 control군에 비해 유의하게 증가했고, cirsimaritin을 1 µg/mL 농도로 처리한 군에서 control군에 비해 유의하게 증가했다.

고찰

본 연구에서는 IFN-γ로 유도한 RAW264.7 대식세포에서 영경 쿼 유래 flavone류인 cirsimar, cirsimaritin, pectolarin, pectolarinigenin, hispidulin을 처리하여 전염증성 cytokine의 수치를 측정하고, 면역증강 활성의 지표물질인 iNOS, COX-2의 발현을 확인하여 본 소재의 효능을 확인했다.

면역 체계는 백혈구와 특정 면역 물질(항체, cytokine)로 구성된 복잡한 네트워크로, 외부에서 침입한 바이러스, 세균, 암세포 등의 항원에 대한 방어에 중요한 역할을 한다[28,29]. 면역 체계의 주요 특징은 자기와 비자기를 구별하는 것으로 정상적인 면역 반응은 감염, 염증성 질환 및 암을 예방하고 치료하기 위해 중요한 신체 방어 방법이다[30]. 면역 체계가 제 기능을 하지 않거나 자기 세포를 외부 병원체로 오인할 경우 자신

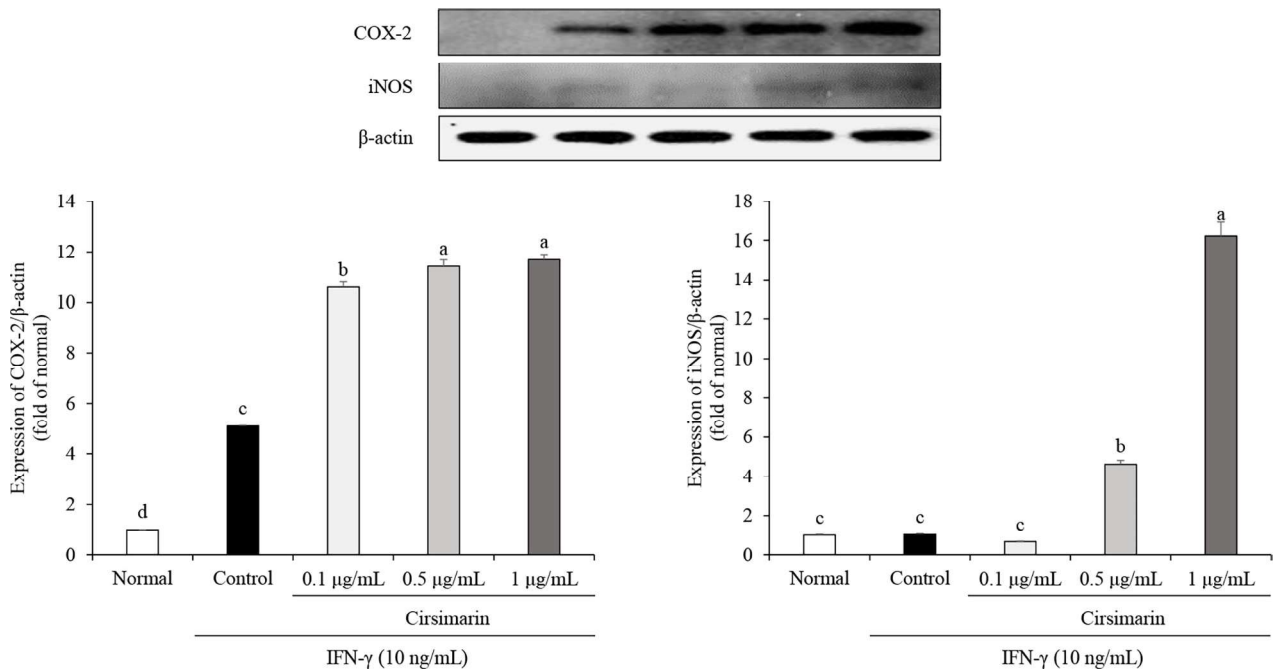


Fig. 4 Effects of cirsimaritin on protein expression of COX-2 and iNOS in IFN- γ -induced RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were induced with IFN- γ (10 ng/mL) followed by stimulation with cirsimaritin (0.1, 0.5, and 1 μ g/mL). The results were expressed as mean \pm SD. The different letters (a-d) among groups represent significant differences by Duncan's multiple range ($p < 0.05$)

의 신체 조직을 공격하여 자가면역 질환을 야기하며, 병원체나 외부 침입물질에 대하여 적절한 면역 반응을 수행하지 못하는 경우 면역결핍 질환이 발생하게 된다[31]. 이러한 바이러스 및 기타 외부 위협으로부터 신체를 보호하기 위해 면역 체계의 기능과 활동을 조절하는 모든 생물학적, 화학적 의약품을 통칭하여 면역조절치료제라고 한다[32]. 이 중 면역증강제는 면역기능을 향진시키는 물질로 면역반응에 효과가 있는 기전 또는 이를 일으키는 매개체를 강화하는 물질 등이 포함된다[33].

인체의 대표적인 면역세포인 대식세포는 평소에는 휴식 상태로 있다가 외부 자극에 의해 활성화되어 외부로부터 침입한 세균 및 이물질을 제거하는 역할을 수행한다[34,35]. IFN- γ 는 강력한 대식세포 활성화제 중 하나로 알려져 있으며, Lee 등[37]은 활성화된 대식세포에서 면역증진 효능을 확인하기 위해 IFN- γ 를 사용하여 RAW264.7 대식세포를 활성화시킨 후 청국장의 다당류 성분들을 처리하였다[36,37]. 따라서 본 연구에서 IFN- γ 를 처리하여 RAW264.7 대식세포를 활성화시킨 후, 영경귀 유래 flavone 성분들을 처리하여 면역 관련 지표들을 확인하였다. 본 연구에서 RAW264.7 대식세포에 영경귀 유래 플라본 성분들을 단독으로 처리하였을 때 1 μ g/mL 농도에서 세포생존율에 큰 변화가 없었으며, cirsimaritin, pectolarin, pectolarigenin 군에서 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 RAW264.7 대식세포에 IFN- γ 를 처리하였을 때 normal 군에 비해 세포생존율이 유의하게 상승하였기 때문에, IFN- γ 에 의해 대식세포가 활성화된 것을 확인할 수 있었다. IFN- γ 로 면역 반응을 활성화시킨 RAW264.7 대식세포에 영경귀 유래 플라본 성분들을 처리하였을 때 cirsimaritin, pectolarin, pectolarigenin, hispidulin을 처리한 군에서는 세포생존율에 큰

변화가 없었으며, cirsimaritin을 처리한 군에서는 농도 유의적으로 세포 생존율이 감소하였다. 따라서 면역과민반응을 방지하기 위해 모든 시료에서 세포 독성이 발생하지 않은 1 μ g/mL의 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

Cytokine은 호르몬이나 신경전달물질만큼 생명에 중요한 신호전달물질로서 세포 간 의사소통을 매개하는 저분자 단백질이며, 주로 면역계의 다양한 세포 유형에 의해 생성된다[38]. 이 분자들은 국소적이고 전신적인 염증의 조절에서부터 세포 증식, 대사에 이르기까지 다양한 과정을 조정하여 면역 반응의 조절에 중요한 역할을 한다[39]. Cytokine은 주로 대식세포와 림프구에 의해 생성되며 현재까지 100개 이상의 다른 cytokine들이 알려져 있으며 본 연구에서는 면역력 강화와 관련한 cytokine들의 수준을 확인했다.

TNF- α 는 급성 염증반응에서 나타나는 cytokine으로 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되어 다양한 감염체와 암세포 등의 공격으로부터 숙주를 보호하는 면역 체계의 매개체이며, 특히 암세포의 자연사를 유도한다고 알려져 있다[40,41]. IL-6는 TNF- α 와 함께 급성 염증반응에서 나타나는 전염증성 cytokine으로 대식세포나 림프구에서 분비되어 면역 반응이 일어나는 여러 단계에 작용하여 면역 반응을 조절함으로써 인체의 방어 작용에 결정적인 역할을 한다[42]. Shin 등[43]은 IFN- γ 로 RAW264.7 대식세포를 활성화시킨 후 *Pediococcus pentosaceus*의 exopolysaccharide fraction을 처리하여 면역증강 효과를 확인하였고, 저농도의 IFN- γ 처리 시 TNF- α , IL-6의 수준이 증가하지 않았기에 면역과민반응이 발생하지 않는 것으로 보고하였다[43]. 본 연구에서 IFN- γ 로 유도한 RAW264.7 대식세포에 영경귀 유래 플라본 성분들을 처리하였을 때 cirsimaritin과 cirsimaritin을 처리

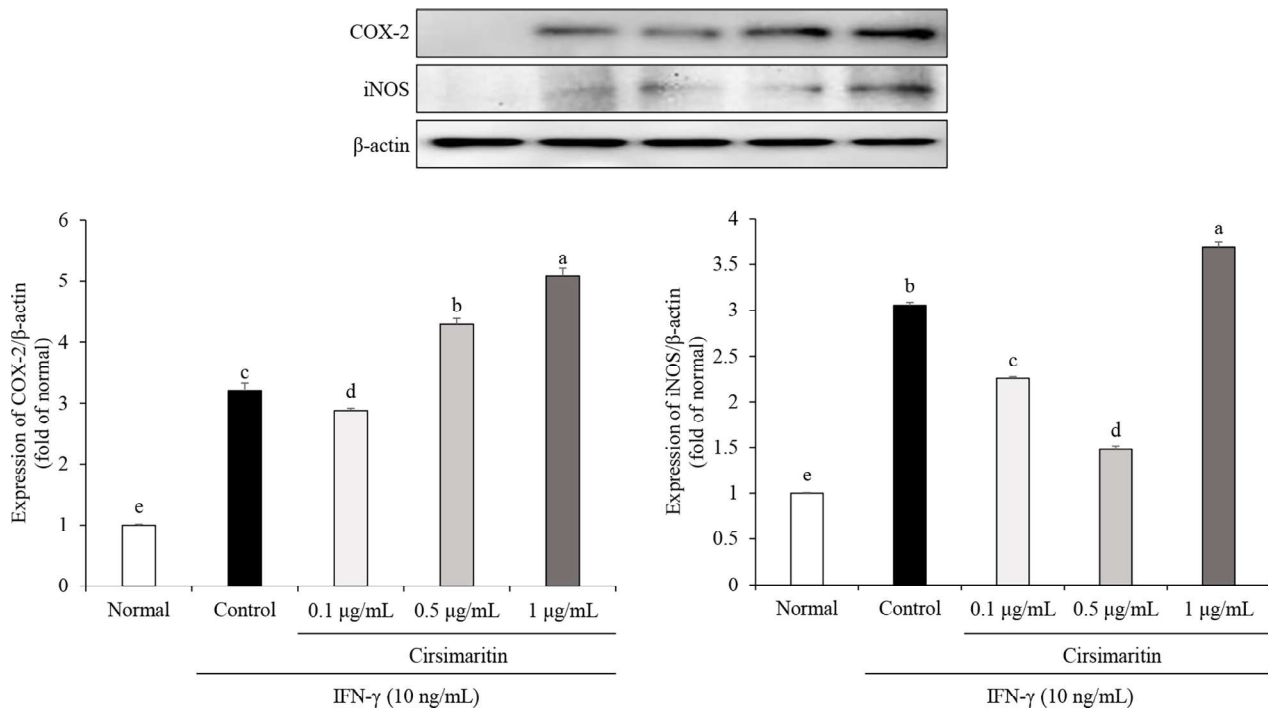


Fig. 5 Effects of cirsimaritin on protein expression of COX-2 and iNOS in IFN- γ -induced RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were induced with IFN- γ (10 ng/mL) followed by stimulation with cirsimaritin (0.1, 0.5, and 1 μ g/mL). The results were expressed as mean \pm SD. The different letters (a-e) among groups represent significant differences by Duncan's multiple range ($p < 0.05$)

한 군에서 TNF- α 와 IL-6 수치가 control군에 비해 유의하게 증가했으며, pectolarin, pectolarinigenin, hispidulin을 처리한 군에서는 오히려 감소하는 경향이 나타났다. 따라서 엉겅퀴 유래 천연물질들 중 pectolarin, pectolarinigenin, hispidulin은 면역력 강화에 효과가 없고, cirsimaritin과 cirsimaritin만이 면역력 강화에 효과가 있는 것을 확인하였다. 각 플라본 성분들을 단독으로 처리하였을 때는 TNF- α 와 IL-6의 수치에 유의한 변화가 나타나지 않았다(supplementary tables 1, 2).

대식세포는 염증 반응의 개시 및 전파 뿐만 아니라 친염증성 또는 항염증성 매개체의 생성을 조절함으로써 세포 항상성을 회복하는데 중요한 역할을 한다[44]. COX-2와 iNOS는 면역증강 활성의 지표물질 중 하나로 대식세포의 스트레스 또는 cytokine 자극으로 대식세포가 활성화되었을 때 발현되어 염증 반응을 매개하는 단백질로 알려져 있다[45]. 이전 연구에서 Lee 등[37]은 IFN- γ 로 RAW264.7 대식세포를 활성화시킨 후 청국장의 다당류 성분들을 처리하여 면역증강 효과를 확인하였고, 100 ng/mL의 IFN- γ 처리 시 iNOS의 발현이 증가하지 않았기에 면역과민 반응이 발생하지 않은 것으로 보고하였다. 면역과민반응의 발생을 최소화하기 위해 IFN- γ 로 유도한 RAW264.7 대식세포에 엉겅퀴 유래 flavone류 중 cirsimaritin과 cirsimaritin을 1 μ g/mL 이하의 농도로 처리하여 면역력 강화에 관한 기전을 추가로 확인하였다. Cirsimaritin을 0.1 μ g/mL의 낮은 농도로 처리하였을 때도 COX-2의 발현이 증가했고, 0.5 μ g/mL로 처리하였을 때는 iNOS의 발현도 증가하였다. 또한 cirsimaritin을 0.5 μ g/mL로 처리하였을 때 COX-2의 발현이 증가했고, 1 μ g/mL로 처리하였을 때 iNOS의 발현도 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 cirsimaritin과 cirsimaritin은 IFN- γ 로 유도한 RAW264.7 대식세포에서 TNF- α 와 IL-6의 수치를 증가시키고, COX-2와 iNOS의 발현을 증가시킴으로 친염증성 cytokine 및 단백질들의 생성을 조절하여 면역력 강화효과를 발휘하는 것으로 확인되었다. 따라서 엉겅퀴 천연물질들 중 cirsimaritin과 cirsimaritin은 식품 성분 또는 식이 보충제로 섭취 시 면역증강에 대한 효과를 낼 수 있는 기능성 식품소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

초 록

마우스 대식세포인 RAW264.7 대식세포에서 엉겅퀴 유래 플라본 성분인 cirsimaritin, cirsimaritin, pectolarin, pectolarinigenin, hispidulin의 면역증강 효과를 확인하였다. Cirsimaritin과 cirsimaritin은 TNF- α , IL-6의 수치를 향상시켰고, 염증 관련인자 (COX-2, iNOS)의 단백질 발현을 증가시켰다. 본 연구에서 엉겅퀴 유래 플라본 성분 중 cirsimaritin과 cirsimaritin은 친염증성 cytokine 및 단백질의 조절을 통해 면역력 증진에 효과가 있는 기능성 식품소재로 활용될 수 있을 것으로 나타났다.

Keywords 기능성 식품 · 대식세포 · 면역증강 활성 · 사이토카인 · 엉겅퀴 · 플라본

감사의 글 이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2023R1A2C1006634).

References

- Galanakis CM, Aldawoud TM, Rizou M, Rowan NJ, Ibrahim SA (2020) Food ingredients and active compounds against the coronavirus disease (COVID-19) pandemic: A comprehensive review. *Foods* 9(11): 1701. doi: 10.3390/foods9111701
- Trinh TA, Park J, Oh JH, Park JS, Lee D, Kim CE, Choi H-S, Kim S-B, Hwang GS, Koo BA (2020) Effect of herbal formulation on immune response enhancement in RAW 264.7 macrophages. *Biomolecules* 10(3): 424. doi: 10.3390/biom10030424
- Lesourd B (2006) Nutritional factors and immunological ageing. *Proc Nutr Soc* 65(3): 319–325. doi: 10.1079/PNS2006507
- Netea MG, Quintin J, Van Der Meer JW (2011) Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9(5): 355–361. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.006
- Netea MG, van der Meer JW (2017) Trained immunity: an ancient way of remembering. *Cell Host Microbe* 21(3): 297–300. doi: 10.1016/j.chom.2017.02.003
- Zebeaman M, Tadesse MG, Bachheti RK, Bachheti A, Gebeyhu R, Chaubey KK (2023) Plants and Plant-Derived Molecules as Natural Immunomodulators. *Biomed Res Int* 2023: 7711297. doi:10.1155/2023/7711297
- Jantan I, Ahmad W, Bukhari SNA (2015) Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in Plant Science* 6: 655. doi: 10.3389/fpls.2015.00655
- Ramanadham M, Nageshwari B (2010) Anti-proliferative effect of levamisole on human myeloma cell lines *in vitro*. *J Immunotoxicol* 7(4): 327–332. doi: 10.3109/1547691X.2010.514871
- Dartel A, Chaigne B, Moachon L, Grenier F, Dupin N, Guillemin L, Bouillet L, Mouthon L (2019) Levamisole-induced vasculopathy: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 48(5): 921–926. doi: 10.1016/j.semarthrit.2018.07.010
- Tsai MH, Yang JH, Kung SL, Hsiao YP (2013) Levamisole-induced myopathy and leukocytoclastic vasculitis: a case report and literature review. *Dermatol Ther* 26(6): 476–480. doi: 10.1111/dth.12018
- Behl T, Kumar K, Brisc C, Rus M, Nistor-Cseppento DC, Bustea C, Aron RAC, Pantis C, Zengin G, Sehgal A (2021) Exploring the multifocal role of phytochemicals as immunomodulators. *Biomed Pharmacother* 133: 110959. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110959
- Zheng S-Y, Li Y, Jiang D, Zhao J, Ge J-F (2012) Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer cell line A-549. *Mol Med Rep* 5(3): 822–826. doi: 10.3892/mmr.2011.726
- Alves MMdM, Brito LM, Souza AC, Queiroz BCSH, de Carvalho TP, Batista JF, Oliveira JSdSM, de Mendonça IL, Lira SRdS, Chaves MH (2017) Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 390: 893–903. doi: 10.1007/s00210-017-1387-y
- Rønning SB, Voldvik V, Bergum SK, Aaby K, Borge GIA (2020) Ellagic acid and urolithin A modulate the immune response in LPS-stimulated U937 monocytic cells and THP-1 differentiated macrophages. *Food Funct* 11(9): 7946–7959. doi: 10.1039/C9FO03008E
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D (2005) *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* 16(6): 360–367. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.01.006
- Lee JH, Jung HK, Han YS, Yoon YM, Yun CW, Sun HY, Cho HW, Lee SH (2016) Antioxidant effects of *Cirsium setidens* extract on oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 14(4): 3777–3784. doi: 10.3892/mmr.2016.5706
- Kim R, Islam MS, Yoo Y-J, Shin H-Y, Lee JH, Cho J-H, Park Y-G, Choi J, Tae H-J, Park B-Y (2022) Anti-inflammatory effects of the *Aralia elata* and *Cirsium japonicum* in Raw 264. 7 cells and *in vivo* colitis model in mice and dogs. *Biomed Pharmacother* 151: 113186. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113186
- Tran THM, Mi X-j, Huh J-E, Mitra PA, Kim Y-J (2023) *Cirsium japonicum* var. *maackii* fermented with *Pediococcus pentosaceus* induces immunostimulatory activity in RAW 264.7 cells, splenocytes and CTX-immunosuppressed mice. *J Funct Foods* 102: 105449. doi: 10.1016/j.jff.2023.105449
- Cho S, Lee J, Lee YK, Chung MJ, Kwon KH, Lee S (2016) Determination of pectolarin in *Cirsium* spp. using HPLC/UV analysis. *J Appl Biol Chem* 59(2): 107–112. doi: 10.3839/jabc.2016.020
- Lee J, Rodriguez JP, Lee KH, Park JY, Kang KS, Hahm D-H, Huh CK, Lee SC, Lee S (2017) Determination of flavonoids from *Cirsium japonicum* var. *maackii* and their inhibitory activities against aldose reductase. *Appl Biol Chem* 60: 487–496. doi: 10.1007/s13765-017-0302-z
- Lu M, Kong Q, Xu X, Lu H, Lu Z, Yu W, Zuo B, Su J, Guo R (2014) Pectolarigenin-a flavonoid compound from *Cirsium japonicum* with potential anti-proliferation activity in mcf-7 breast cancer cell. *Trop J Pharm Res* 13(2): 225–228. doi: 10.4314/tjpr.v13i2.9
- Yang Y, Xing R, Liu S, Qin Y, Li K, Yu H, Li P (2018) Immunostimulatory effects of sulfated chitosans on RAW 264.7 mouse macrophages via the activation of PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Biol Macromol* 108: 1310–1321. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.042
- Lee KY, Jeon YJ (2005) Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus*. *Int Immunopharmacol* 5(7-8): 1225–1233. doi: 10.1016/j.intimp.2005.02.020
- Cheng A, Wan F, Wang J, Jin Z, Xu X (2008) Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *Int Immunopharmacol* 8(1): 43–50. doi: 10.1016/j.intimp.2007.10.006
- Belardelli F (1995) Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apms* 103(1-6): 161–179. doi: 10.1111/j.1699-0463.1995.tb01092.x
- Li Y, Meng T, Hao N, Tao H, Zou S, Li M, Ming P, Ding H, Dong J, Feng S (2017) Immune regulation mechanism of Astragaloside IV on RAW264. 7 cells through activating the NF- κ B/MAPK signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 49: 38–49. doi: 10.1016/j.intimp.2017.05.017
- He F (2011) Bradford protein assay. *Bio-protoc* 1(6): e45. doi: 10.21769/BioProtoc.45
- Desai A, Grolleau-Julius A, Yung R (2010) Leukocyte function in the aging immune system. *J Leukoc Biol* 87(6): 1001–1009. doi: 10.1189/jlb.0809542
- Monmai C, Kim J-S, Baek S-H (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
- Mitra S, Paul S, Roy S, Sutradhar H, Bin Emran T, Nainu F, Khandaker MU, Almalki M, Wilairatana P, Mubarak MS (2022) Exploring the immune-boosting functions of vitamins and minerals as nutritional food bioactive compounds: A comprehensive review. *Molecules* 27(2): 555. doi: 10.3390/molecules27020555
- Etzioni A (2003) Immune deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2(6): 364–369. doi: 10.1016/S1568-9972(03)00052-1
- Janakiram NB, Mohammed A, Madka V, Kumar G, Rao CV (2016) Prevention and treatment of cancers by immune modulating nutrients. *Mol Nutr Food Res* 60(6): 1275–1294. doi: 10.1002/mnfr.201500884
- Jiang L, Zhang G, Li Y, Shi G, Li M (2021) Potential application of plant-based functional foods in the development of immune boosters. *Front pharmacol* 12: 637782. doi: 10.3389/fphar.2021.637782
- Sieweke MH, Allen JE (2013) Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 342(6161): 1242974. doi: 10.1126/science.1242974
- Huber C, Stingl G (1981) Macrophages in the regulation of immunity. In: *Disorders of the Monocyte Macrophage System: Pathophysiological and Clinical Aspects*. Springer, New York

36. Arango Duque G, Descoteaux A (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5: 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491
37. Lee S-J, Rim H-K, Jung J-Y, An H-J, Shin J-S, Cho C-W, Rhee YK, Hong H-D, Lee K-T (2013) Immunostimulatory activity of polysaccharides from Cheonggukjang. *FCT* 59: 476–484. doi: 10.1016/j.fct.2013.06.045
38. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M (2013) Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol* 2013. doi: 10.1155/2013/503754
39. Dinarello CA (2007) Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37(S1): S34–S45. doi: 10.1002/eji.200737772
40. Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6: 13. doi: 10.12703/P6-13
41. Grazul M, Kwiatkowski P, Hartman K, Kilanowicz A, Sienkiewicz M (2023) How to Naturally Support the Immune System in Inflammation —Essential Oils as Immune Boosters. *Biomedicines* 11(9): 2381. doi: 10.3390/biomedicines11092381
42. Tauber AI (2003) Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(11): 897–901. doi: 10.1038/nrm1244
43. Shin JS, Jung JY, Lee SG, Shin KS, Rhee YK, Lee MK, Hong HD, Lee KT (2016) Exopolysaccharide fraction from *Pediococcus pentosaceus* KFT18 induces immunostimulatory activity in macrophages and immunosuppressed mice. *J Appl Microbiol* 120: 1390–1402. doi: 10.1111/jam.13099
44. Mosser DM, Hamidzadeh K, Goncalves R (2021) Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cell Mol Immunol* 18: 579–587. doi: 10.1038/s41423-020-00541-3
45. Kim JG, Dong X, Park SH, Bayazid AB, Jeoung SA, Lim BO (2021) Bioconversion of black rice and blueberry regulate immunity system through regulation of MAPKs, NF- κ B in RAW264. 7 macrophage cells. *Food Agric Immunol* 32(1): 471–481. doi: 10.1080/09540105.2021.1956434