



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

RAW264.7 대식세포에서  
파파야 및 오크라 추출물의  
면역활성 증진효과

제주대학교 대학원

화학과

고민녕

2022년 2월

RAW264.7 대식세포에서  
파파야 및 오크라 추출물의  
면역활성 증진효과




지도교수 현 창 구

고 민 녕

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2022년 2월

고민녕의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 李南昊   
위 원 裴世源   
위 원 玄昌久 

제주대학교 대학원

2022년 2월

Immunomodulating activity of  
*Carica papaya* and *Abelmoschus esculentus*  
extracts in mouse RAW 264.7 macrophages

Min Nyeong Ko  
(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for  
the degree of Master of Science

2021. 12.

This thesis has been examined and approved by

Nam Ho Lee

Se Won Bae

CHANG-GU HYUN

12/17

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



# ABSTRACT

The recent global spread of COVID-19 has resulted in high levels of morbidity and mortality. Since then, as it has been found that lowering immunity affects the spread of COVID-19, the importance of immunity is getting more attention. Therefore, many researchers are developing natural products that have an excellent effect on regulating the immune function of the body or strengthening the immune system. In this study, papaya leaf water extract (PLW) and okra leaf water extract (OLW) were found to significantly increase the levels of nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) by upregulating inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclo-oxygenase-2 (COX-2) activity, respectively. Additionally, PLW and OLW increased the production of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  in RAW 264.7 cells. Furthermore, PLW and OLW activated the expression of c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase (ERK). These results indicate that PLW and OLW increased the production of NO, PGE<sub>2</sub>, and pro-inflammatory cytokines by activating the JNK, p38 and ERK pathways in RAW 264.7 macrophages, thus demonstrating immunomodulatory properties. Finally, several metabolites such as flavonoid, alkaloid present in PLW and OLW also were analyzed through UPLC-Q-TOF MS in this study. Taken together, this study shows that PLW and OLW can act as immunoactive factors that stimulate and activate RAW 264.7 cells. In addition, it was finally confirmed that the MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways are involved in this immune activity enhancing effect. Therefore, it is judged that PLW and OLW can be developed as natural materials with immune activation effects.

**Key words:** *Abelmoschus esculentus*, *Carica papaya*, immunomodulation, macrophage RAW 264.7, okra, pappya

# 목 차

ABSTRACT .....	1
목 차 .....	2
LIST OF TABLES .....	4
LIST OF FIGURES .....	5
I. 서 론 .....	7
II. 재료 및 방법 .....	11
1. 시료 및 시약 .....	11
2. 실험방법 .....	12
2.1. 추출물 제조 .....	12
2.2. 세포 배양 .....	13
2.3. 세포 생존율 측정 .....	14
2.4. NO 생성량 측정 .....	15
2.5. Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) 및 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 생성량 측정 .....	16
2.6. Western blot .....	17
2.7. UPLC-Q-TOF MS 분석 .....	18
3. 통계처리 .....	20
III. 결 과 .....	21
1. 세포 생존율 측정 .....	21

2. NO 생성량 측정 .....	23
3. Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) 생성량 측정 .....	25
4. 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 생성량 측정 .....	27
4.1. TNF- $\alpha$ 생성량 측정 .....	28
4.2. IL-1 $\beta$ 생성량 측정 .....	30
5. Western blot .....	32
5.1. PLW와 OLW의 iNOS 발현에 미치는 효과 .....	32
5.2. PLW와 OLW의 COX-2 발현에 미치는 효과 .....	34
5.3. PLW와 OLW의 MAPK 발현에 미치는 효과 .....	36
5.4. PLW와 OLW의 NF- $\kappa$ B 발현에 미치는 효과 .....	39
6. 대사산물 분석 .....	43
IV. 고    찰 .....	48
V. 참고문헌 .....	53

# LIST OF TABLES

**Table 1.** Conditions for UPLC-Q-TOF MS analysis of PLW and OLW ..... 19

**Table 2.** Mass data of the nineteen analytes from PLW by UPLC-Q-TOF MS  
..... 45

**Table 3.** Mass data of the four analytes from OLW by UPLC-Q-TOF MS  
..... 47



# LIST OF FIGURES

<b>Figure 1.</b> The possible molecular mechanisms of immunomodulatory activity of LPS .....	9
<b>Figure 2.</b> Effect of (a) PLW, (b) OLW on cell viability of RAW 264.7 cells using the MTT assay .....	22
<b>Figure 3.</b> Effect of (a) PLW, (b) OLW on production of nitric oxide in RAW 264.7 cells using the Griess assay .....	24
<b>Figure 4.</b> Effect of (a) PLW, (b) OLW on PGE <sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells .....	26
<b>Figure 5.</b> Effect of (a) PLW, (b) OLW on TNF- $\alpha$ production in RAW 264.7 cells .....	29
<b>Figure 6.</b> Effect of (a) PLW, (b) OLW on IL-1 $\beta$ production in RAW 264.7 cells .....	31
<b>Figure 7.</b> Effect of (a) PLW, (b) OLW on protein expression of iNOS in RAW 264.7 cells .....	33
<b>Figure 8.</b> Effect of (a) PLW, (b) OLW on protein expression of COX-2 in RAW 264.7 cells .....	35
<b>Figure 9.</b> Effect of PLW on protein expression of MAPK phosphorylation in RAW 264.7 cells .....	37

<b>Figure 10.</b> Effect of OLW on protein expression of MAPK phosphorylation in RAW 264.7 cells .....	38
<b>Figure 11.</b> Effect of (a) PLW, (b) OLW on protein expression of I $\kappa$ B $\alpha$ in RAW 264.7 cells .....	40
<b>Figure 12.</b> Effect of PLW on protein expression of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells .....	41
<b>Figure 13.</b> Effect of OLW on protein expression of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells .....	42
<b>Figure 14.</b> The total ion chromatograms of the PLW by UPLC-Q-TOF MS in (a) positive- and (b) negative-ion modes .....	44
<b>Figure 15.</b> The total ion chromatograms of the OLW by UPLC-Q-TOF MS in (a) positive- and (b) negative-ion modes .....	46
<b>Figure 16.</b> The possible molecular mechanisms of immunomodulatory activity of PLW .....	51
<b>Figure 17.</b> The possible molecular mechanisms of immunomodulatory activity of OLW .....	52

## I. 서론

최근 전 세계적으로 확산된 Coronavirus disease-2019 (COVID-19)는 높은 수준의 발병률과 사망률을 초래했다[1]. 이후 면역력 저하가 COVID-19 확산에 영향을 미친다는 것이 밝혀지면서[2] 면역력에 대한 중요성은 더욱 주목받고 있다. 그래서 많은 연구진이 체내의 면역 기능을 조절하거나 면역력 강화에 탁월한 효과를 보이는 천연물 개발 연구를 하고 있다[3-5].

면역 (Immunity)은 외부에서 체내로 외부 병원체 (pathogen)가 들어왔을 때, 자신을 보호하고자 하는 생체방어 반응이다. 인간의 면역 체계는 자연살해세포 (natural killer cell), 대식세포 (macrophage), 과립구 (granulocyte) 및 단핵구 (monocyte)를 포함한 세포 간의 상호작용에 의해 항상성 (homeostasis)이 유지된다[6,7]. 면역세포 중 대식세포는 선천면역 (innate immunity)과 적응면역 (adaptive immunity) 모두 기여하는 것으로 알려져 있다. 활성화된 대식세포는 탐식 작용 (phagocytosis)을 통해 외부 병원체를 제거하고 nitric oxide (NO) 및 Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)와 같은 염증유발 인자와 interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 와 같은 다양한 전염증성 (pro-inflammatory) cytokine을 분비하여 면역 반응을 극대화시킨다. 그리고 외부 병원체를 T 세포 (T cell)에 제시하고 다양한 cytokine의 분비를 통해 T 세포와 B 세포 (B cell)를 활성화한다[8,9].

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균 (Gram-negative bacteria)의 외막의 주요 구성성분 중 하나로, 면역계 (immune system)는 감염을 통해 지속적으로 낮은 수준의 LPS에 노출된다[10]. LPS는 대식세포 표면의 Toll-like receptor 4 (TLR4)를 자극하여 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호 전달 경로를 활성화한다. 이 경로는 유전자발현 (gene expression), 면역반응 (immune response), 세포 증식, 세포 사멸 (apoptosis) 및 산화 스트레스에 대한 반응 등 다양한 세포 과정을 조절하고 전염증성 cytokine의 발현을 유도하는 데 중요한

역할을 한다. MAPK는 Extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38)로 세 가지가 있으며 동시에 또는 독립적으로 활성화될 수 있다[11-13].

TLR4는 또한 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)의 핵으로의 전위를 촉진하는 신호 전달 경로를 매개한다[14]. NF- $\kappa$ B는 조절단백질인 inhibitor kappaB-alpha (I $\kappa$ B- $\alpha$ )와 결합하여 비활성 형태로 세포질에 존재한다. LPS를 포함한 다양한 신호에 의해 자극될 때, I $\kappa$ B- $\alpha$ 가 인산화되어 NF- $\kappa$ B dimer (p65/p50)에서 떨어져 나가고 이는 NF- $\kappa$ B dimer가 핵으로 전위되어 전염증성 cytokine의 발현을 유도한다[15,16].

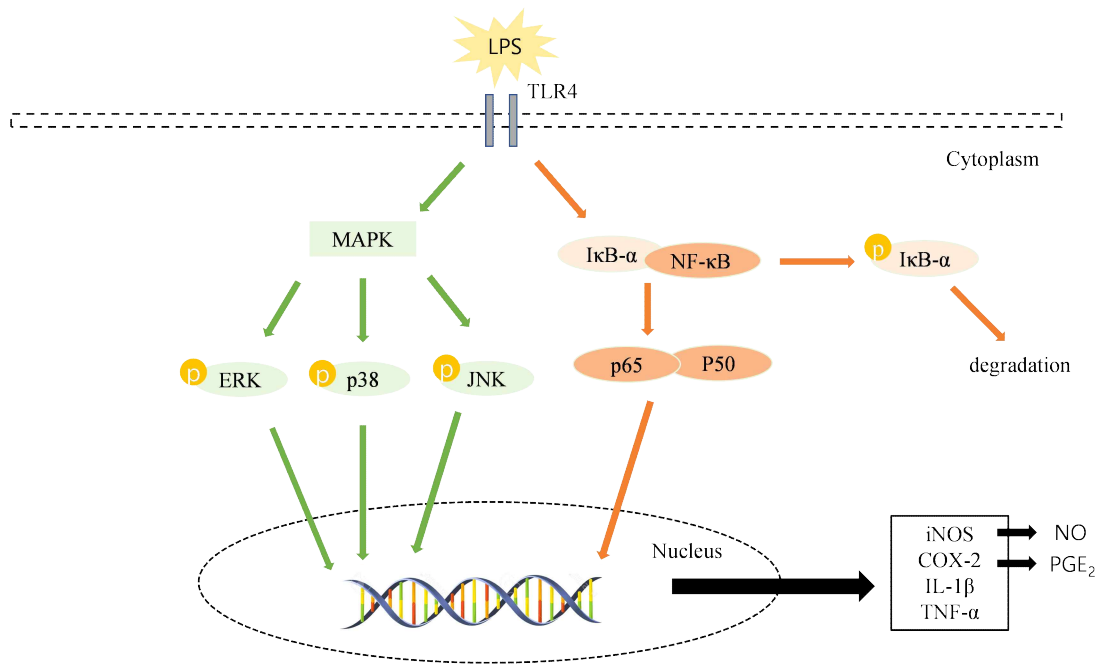


Figure 1. The possible molecular mechanisms of immunomodulatory activity of LPS.

지구온난화 (Global warming)로 인해 우리나라의 평균 기온이 10년마다 0.2 7℃씩 증가하고 있다. 기온상승 현상이 일어나면서 우리나라의 재배작물의 종류, 적지 (right land) 등 기후시스템에도 변화가 일어나고 있다. 우리나라에서 재배하기 어려웠던 아열대 (subtropic) 작물들이 제주지역 및 남해안을 중심으로 등장하고 점점 그 종류가 다양해지고 있다[17-19]. 그리고 제주지역의 경우, 온난화 대응농업연구소가 국가 아열대 작물 재배와 보급을 총괄하므로 아열대 작물 산업을 육성하는 데 여건이 잘 마련되어 있고 제주특별자치도농업기술원은 기후변화에 맞서 제주지역에 적합한 아열대 작물을 도입, 재배하기 위한 연구사업을 추진하고 있다[20].

*Carica papaya* (papaya, 파파야)는 멕시코와 남미 북부가 원산지로서, 열대 및 아열대 지역에서 재배되는 주요 작물 중 하나이다. 파파야과에 속하며 잎 (leaf), 뿌리 (root), 과일 (fruit), 꽃 (flower) 등 여러 부위는 전통 의학에서 사용되어 왔으며, 그중 다수는 과학적 연구에 의해 검증되었다[21,22]. 잎의 경우, 항산화 (antioxidant), 항암 (anticancer)[23], 항균 (antibacterial)[24,25], 항염 (anti-inflammatory)[26], 항뎅기열 (anti-dengue)[27], 항당뇨 (anti-diabetic)[28], 피부 광손상 (photodamage) 보호 효과[29]가 있다. 또한 saponin, flavonoid, alkaloid, tannin과 같은 다양한 화합물의 존재가 밝혀져 있다[30-32].

*Abelmoschus esculentus* (okra, 오크라)는 아욱과에 속하는 종으로 열대 및 아열대 지역에서 많이 재배된다[33]. 에티오피아에서 처음 발견되었으며, 20세기 초에 인도에서 중국으로 유입되었다. 전통적으로 이뇨제 (diuretic), 완화제, 간염 (hepatitis), 대장염 (colitis) 및 황달 (jaundice) 치료에 사용하였고[34,35] 항당뇨 [36,37], 항산화[38] 효과가 있다고 알려져 있다. 부위별로 오크라에 존재하는 생리활성물질은 여러 연구를 통해 잘 알려져 있다. 그중 잎에는 tannin, mineral, flavonol glycoside가 포함되어 있다[39,40].

파파야와 오크라의 기능성 연구가 많이 보고되어왔으나 대식세포와 관련하여 면역 활성 증진에 관한 연구는 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 파파야와 오크라 잎 추출물의 면역활성 증진 효과를 확인하고 그에 대한 작용기전을 확인하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicillin-streptomycin (P/S), BCA protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum은 Merck Millipore (Burlington, MA, United States), skim milk는 BD Difco (Sparks, MD, USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide (LPS), griess reagent, protease/phosphatase inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate (SDS), tris-buffered saline (TBS), phosphate buffered saline (PBS), radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, enhanced chemiluminescence (ECL) kit, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다. Tween 20과 2× Laemmli sample buffer는 Bio-rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다. 1차 항체인 p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, iNOS, COX-2, p-IκB-α, IκB-α, p65, β-actin과 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit antibodies는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D systems Inc. (St, Louis, MO, USA), BD Biosciences (San Diego, CA, USA) 및 Abcam (Cambridge, Cambridgeshire, UK)에서 구입하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 추출물 제조

본 연구에서 사용된 파파야와 오크라 잎은 온난화대응농업연구소 (Jeju, Korea)에서 구했다. 건조된 잎을 잘게 분쇄하고 증류수를 넣어 65℃에서 4시간 동안 추출하였다. 여과한 후, 회전진공농축기를 통해 용매를 제거하고 동결건조 하였다.



## 2.2. 세포 배양

한국세포주은행 (KCLB; Seoul, Korea)에서 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 분양받아 사용하였다. 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin (P/S)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2일 간격으로 계대배양하였다.

### 2.3. 세포 생존율 측정

파파야 추출물 (PLW), 오크라 추출물 (OLW)이 RAW 264.7 세포의 생존에 미치는 영향은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. RAW 264.7 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 24-well plate에 분주하여 24시간 동안 전 배양한 뒤 PLW, OLW를 농도별로 처리한 후, 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액을 0.2 mg/mL이 되도록 가하고 4시간 반응시켰다. MTT 용액을 모두 제거하고 DMSO를 넣어 형성된 formazan 결정을 용해시켰다. 96-well plate에 100  $\mu$ L씩 옮겨 담아 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.4. NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하고 24 시간 동안 전 배양한 후에 농도별로 PLW, OLW을 처리하고 24시간을 더 배양하였다. 96-well plate에 배양액의 상층액과 Griess 시약을 100  $\mu$ L씩 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.5. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 및 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 생성량 측정

세포 배양액 내에 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 생성량을 효소면역정량법 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 방법을 이용하였다. 24-well plate에 RAW 264.7 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. PLW, OLW를 농도별로 처리한 후, 24시간을 더 배양하였다. 15,000 rpm 속도로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 수집하였고 ELISA kit 제조사의 분석 방법에 따라 정량하였다.

## 2.6. Western blot

RAW 264.7 세포를 60 mm culture dish에  $6 \times 10^5$  cells/dish의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. PLW, OLW를 농도별로 20분에서 24시간까지 단백질 발현 시간에 따라 처리하였다. 배지를 제거하고  $1 \times$  PBS로 1회 세척한 후, protease/phosphatase inhibitor cocktail이 1% 첨가된 RIPA buffer를 가하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 20분간 세포를 용해시켰다. 15,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 분리한 단백질의 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준화한 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였다. 30  $\mu\text{g}$ 의 단백질과  $2 \times$  Laemmli sample buffer를 동량으로 섞어  $100^\circ\text{C}$ 에서 5분 동안 불활성화시킨 후, 10% SDS polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 transfer 하여 5% skim milk에 1시간 30분 동안 blocking 하였다. Membrane을 0.1% Tween-20이 첨가된 Tris-buffered saline buffer ( $1 \times$  TBS-T)로 10분씩 6번 세척하고 1:2000으로 희석한 1차 항체를  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight 시켰다. 그런 다음  $1 \times$  TBS-T로 10분씩 6번 세척하고 1:2000으로 희석한 2차 항체를 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시  $1 \times$  TBS-T로 10분씩 6번 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) kit를 이용하여 Chemidoc (Fusion solo 6S.WL, VILBER LOURMAT, France)를 통해 단백질 발현 변화를 확인하였다.

## 2.7. UPLC-Q-TOF MS 분석

(주)이지메스를 통해 PLW와 OLW의 대사산물을 분석하였다. UPLC-Q-TOF MS 시스템(Vion, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. 분석 Column은 Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm; Waters)을 사용했으며, 유속은 0.35 mL/min로 유지하였다. LC/MS 물질 동정은 UNIFI version 1.9.2.045, Chempider database, Metlin database, human metabolome database, EZmass database, authentic standards를 사용하였다.

**Table 1. Conditions for UPLC-Q-TOF MS analysis of PLW and OLW.**

<b>LC condition</b>			
Inject volume	1 $\mu$ L		
Column	Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 $\mu$ m; Waters)		
Solvent	A : water with 0.1% formic acid (FA) B : acetonitrile (ACN) with 0.1 FA		
Flow rate	0.35 mL/min		
<b>MS condition</b>			
<b>ESI-positive mode</b>		<b>ESI-negative mode</b>	
Capillary voltage	3 kV	Capillary voltage	2.5 kV
Sample cone voltage	30 V	Sample cone voltage	20 V
Desolvation gas flow	800 L/h	Desolvation gas flow	900 L/h
Lock mass	Leucine-enkephalin (556.2771 Da)	Lock mass	Leucine-enkephalin (554.2615 Da)
Cone gas flow	30 L/h		
Desolvation temperature	400 $^{\circ}$ C		
Ion source temperature	100 $^{\circ}$ C		
Data collection	m/z 50-1,500 range with a scan time of 0.2 s		
<b>MS/MS condition</b>			
Collision energy ramp from 10-30 eV (m/z 50-1,500)			

### 3. 통계처리

모든 결과는 세 번의 실험을 시행하여 평균  $\pm$  SD (표준편차)로 표시하였다. 실험 결과에 대한 통계처리는 student's t-test를 사용하였다. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 로 표시하여  $p$ -value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 간주하였다.

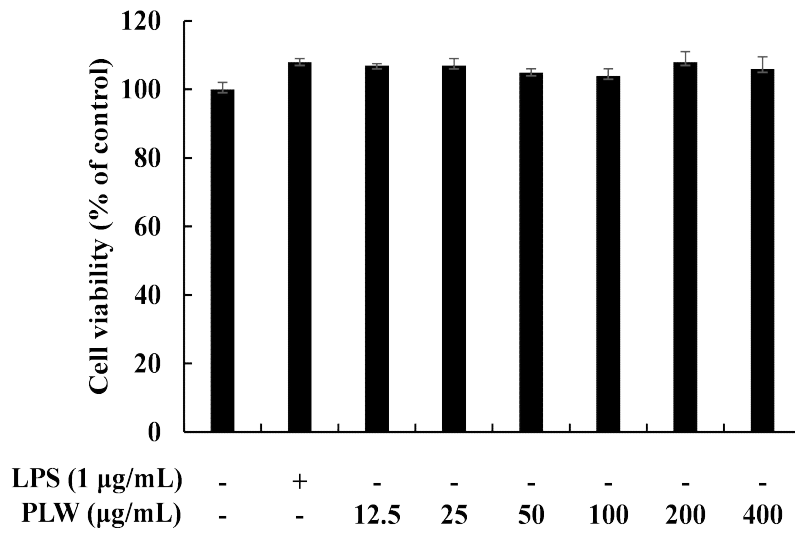


### Ⅲ. 결 과

#### 1. 세포 생존율 측정

세포 생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 이용하였다. MTT tetrazolium은 노란색을 띠는 수용성 물질로서 살아있는 세포에 있는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 보라색의 비수용성인 formazan으로 환원된다. 형성된 formazan의 양은 살아있는 세포의 수에 비례하며, 이는 formazan을 유기용매에 용해시킨 후 분광광도계로 측정할 수 있다[41,42]. MTT assay로 통한 세포 생존율을 알아본 결과, 처리한 모든 농도에서 RAW 264.7 세포의 생존에 영향을 미치지 않았다 (Figure. 2). 따라서 PLW는 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , OWL은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 후속 실험을 진행하였다.

(a)



(b)

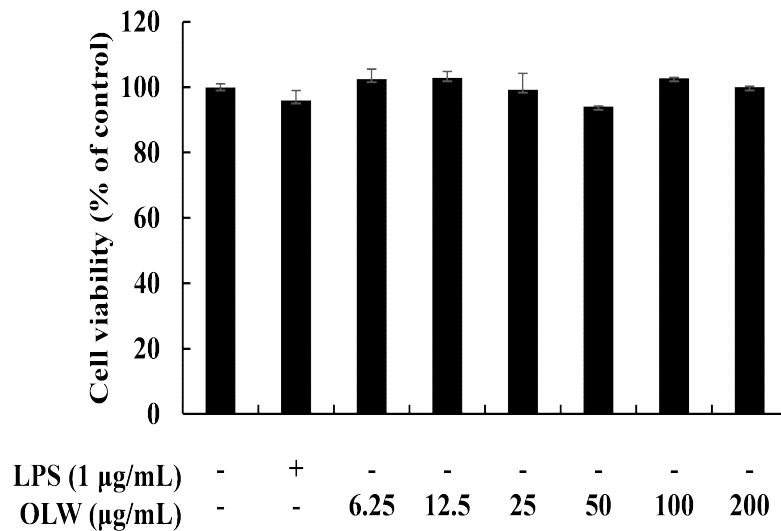
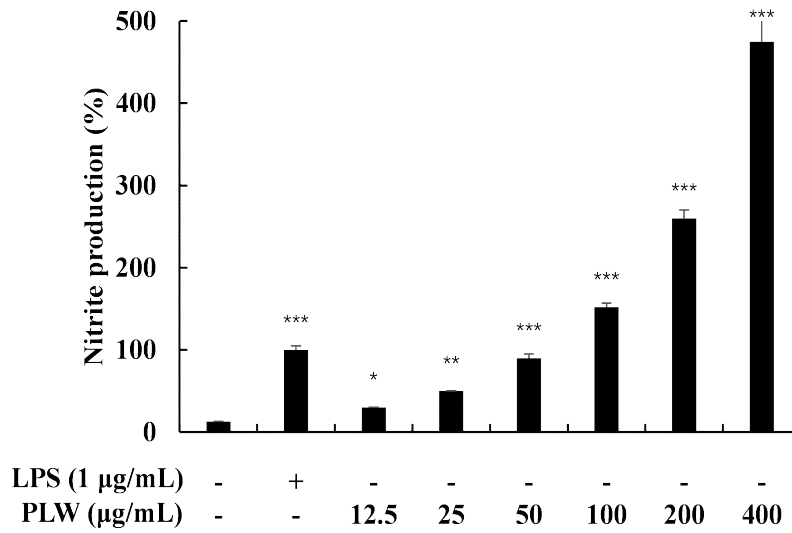


Figure 2. Effect of (a) PLW, (b) OLW on cell viability of RAW 264.7 cells using the MTT assay. RAW 264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h, and then treated with (a) PLW (12.5–400 µg/mL), (b) OLW (6.25–200 µg/mL) for 24 h. Cell viability was evaluated using the MTT assay. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments.

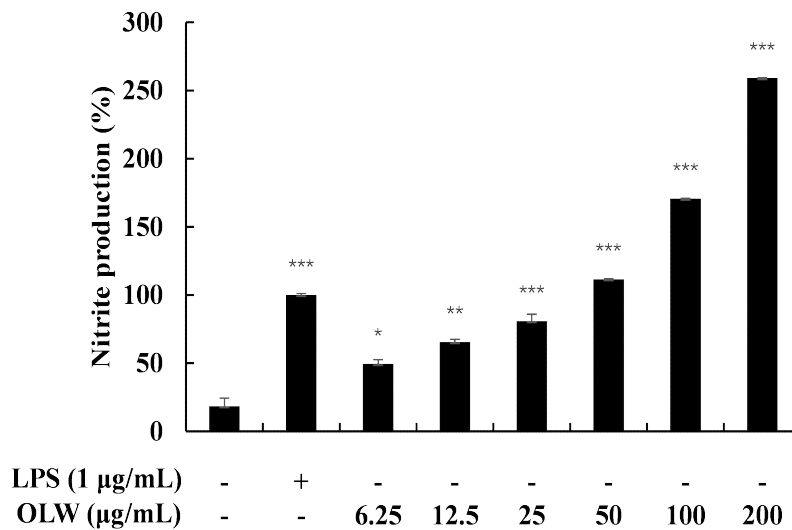
## 2. NO 생성량 측정

PLW에서 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리한 군은 무처리군보다 5.5배 더 많은 NO를 생성했다. PLW만 처리한 군은 농도 의존적으로 NO의 양이 증가하였다. 최고 농도인 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 무처리군보다 26배 더 많은 NO를 생성했다(Figure 3(a)). OLW의 경우, LPS로 처리한 군에서 NO가 5.5배 더 생성되었다. 생성된 NO의 양이 농도 의존적으로 증가하였으며, 최고 농도인 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 무처리군의 NO의 양은 14배 차이 난다(Figure 3(b)). RAW 264.7 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 농도에서 NO의 증가는 세포가 정상적인 면역 반응을 나타내고 있다는 것을 알 수 있다.

(a)



(b)

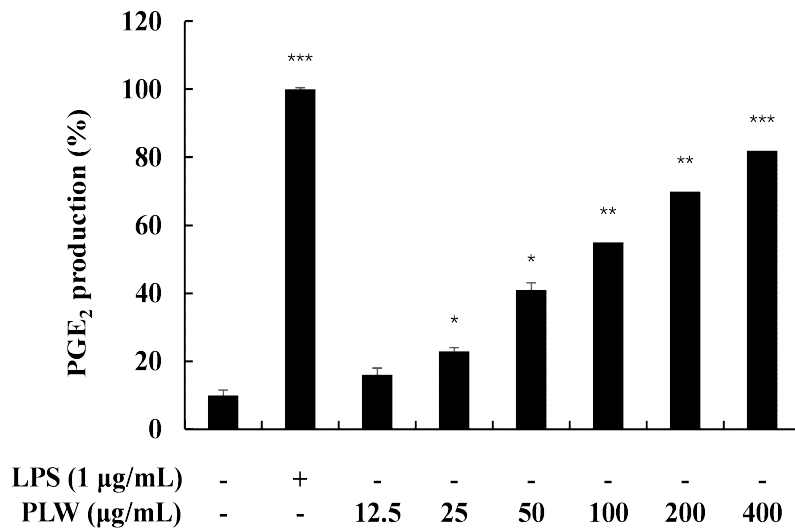


**Figure 3. Effect of (a) PLW, (b) OLW on production of nitric oxide in RAW 264.7 cells using the Griess assay.** RAW 264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h, and then treated with (a) PLW (12.5–400 µg/mL), (b) OLW (6.25–200 µg/mL) for 24 h. Nitrite in the medium was determined by the Griess assay. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.

### 3. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성량 측정

PLW, OLW를 다양한 농도로 처리하여 RAW 264.7 세포에서 PGE<sub>2</sub> 생성에 대한 효과를 측정하였다(Figure 4). LPS로 처리한 군에서 PGE<sub>2</sub>의 생성은 무처리군과 비교해 각각 약 9.3배, 5.9배 증가하였다. PLW (12.5-400 µg/mL) 및 OLW (6.25-200 µg/mL) 각각의 처리 농도에서는 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub>의 생성이 증가하였다. 특히 무처리군보다 고농도의 PLW (400 µg/mL)에서 약 8.2배, OLW (200 µg/mL)에서 약 5.4배로 PGE<sub>2</sub>의 생성이 나타났다.

(a)



(b)

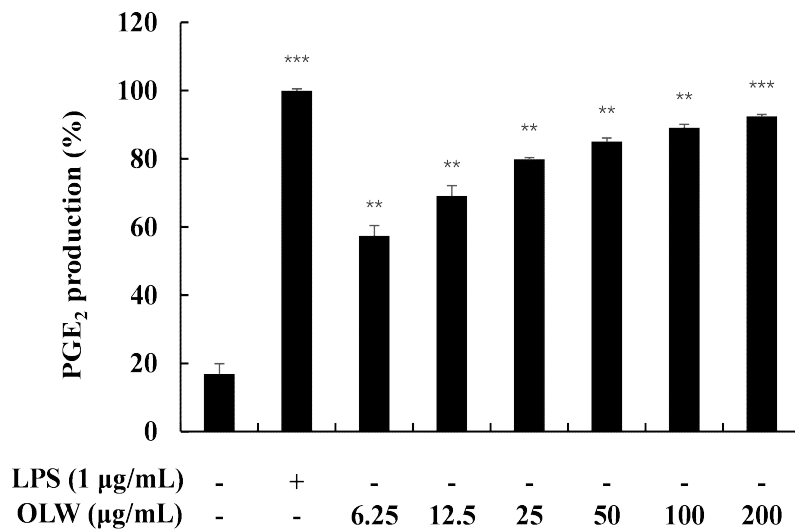


Figure 4. Effect of (a) PLW, (b) OLW on PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h, and then treated with (a) PLW (12.5-400 µg/mL), (b) OLW (6.25-200 µg/mL) for 24 h. The culture supernatant was collected and analyzed for levels of PGE<sub>2</sub>. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001, \*\* $p$  < 0.01 and \* $p$  < 0.05 compared with control group.

#### 4. 전염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 생성량 측정

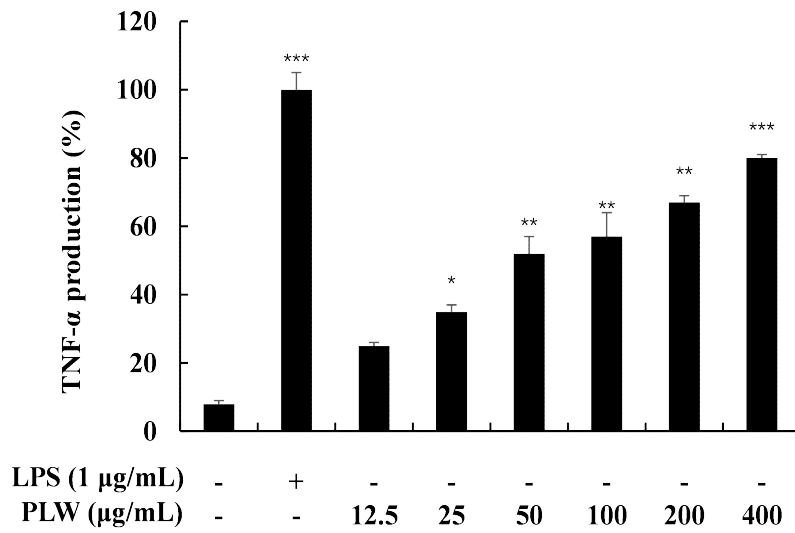
Cytokine은 세포 간에 정보를 전달할 수 있으므로 선천성 및 적응성 면역 반응의 매개체 역할을 한다. Cytokine은 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 담당한다[43]. 전염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 발현에 PLW와 OLW가 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

#### 4.1. TNF- $\alpha$ 생성량 측정

RAW 264.7 세포는 LPS에 의해 TNF- $\alpha$  생성량이 각각 약 14.0배, 약 22.7배 증가하였다. 또한, PLW (12.5-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 및 OLW (6.25-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 각각의 처리 농도에서 TNF- $\alpha$  생성량이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인하였다. 무처리군과 비교하여 PLW, OLW 최고 농도에서 약 11.0배, 약 20.0배의 생성 효과를 나타내었다(Figure 5).



(a)



(b)

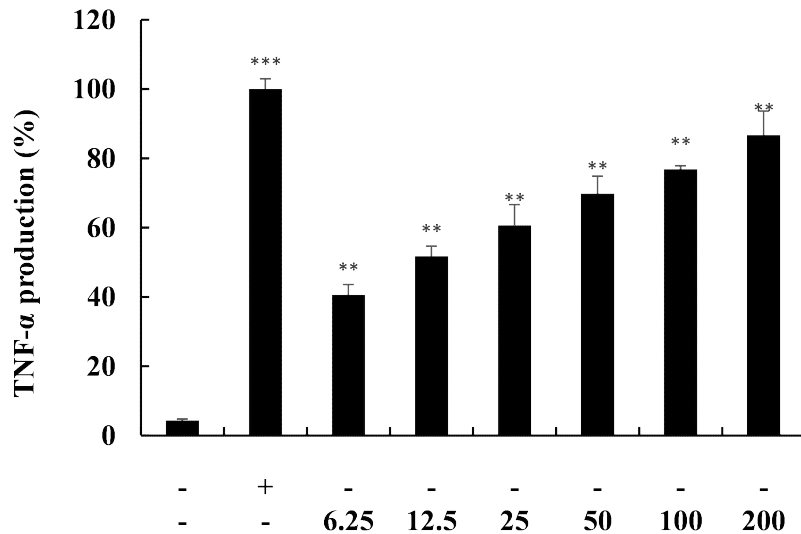
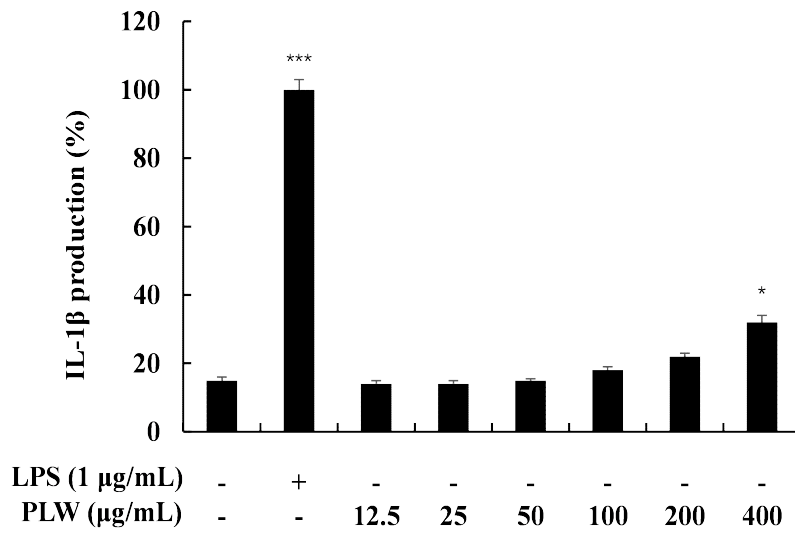


Figure 5. Effect of (a) PLW, (b) OLW on TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h, and then treated with (a) PLW (12.5-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), (b) OLW (6.25-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h. The culture supernatant was collected and analyzed for levels of TNF- $\alpha$ . The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.

## 4.2. IL-1 $\beta$ 생성량 측정

RAW 264.7 세포는 LPS에 의해 IL-1 $\beta$  생성량이 약 6.7배 증가하였다. 무처리 군과 비교하여 PLW, OLW는 최고 농도에서 약 2.2배, 약 3.6배의 생성 효과를 나타내었으며, 각각의 처리 농도에서 IL-1 $\beta$  생성량이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인하였다(Figure 6).

(a)



(b)

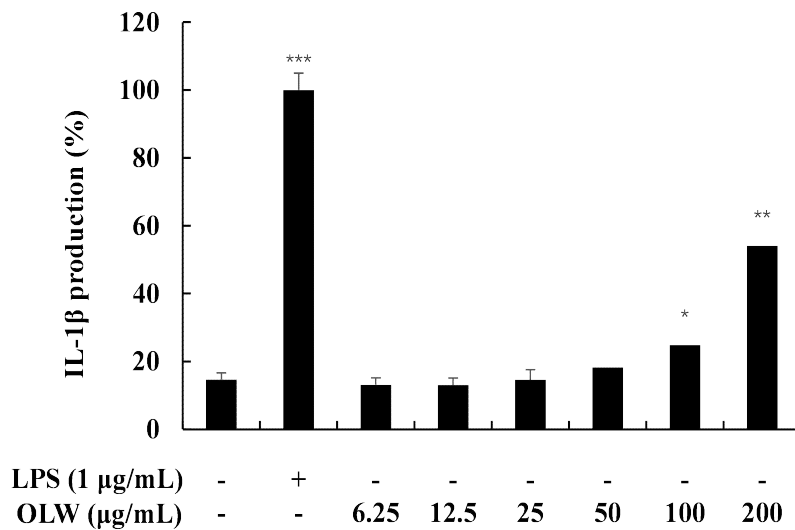
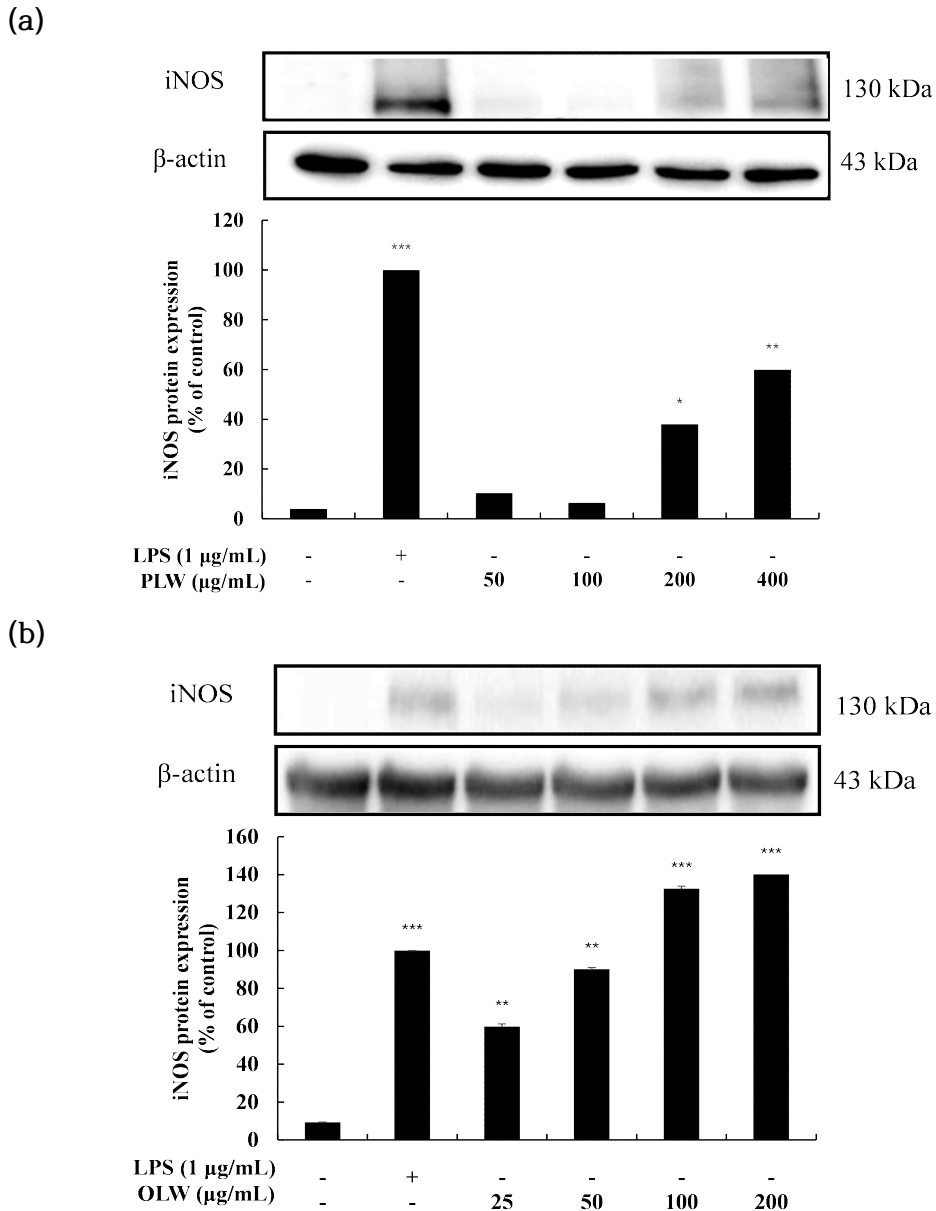


Figure 6. Effect of (a) PLW, (b) OLW on IL-1 $\beta$  production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h, and then treated with (a) PLW (12.5-400  $\mu\text{g/mL}$ ), (b) OLW (6.25-200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. The culture supernatant was collected and analyzed for levels of IL-1 $\beta$ . The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.

## 5. Western blot

### 5.1. PLW와 OLW의 iNOS 발현에 미치는 효과

RAW 264.7 세포에서 PLW, OLW가 NO 생성을 증가시킨다는 것을 확인하고 NO의 생성을 촉진하는 단백질인 iNOS 발현을 western blot으로 확인하였다. iNOS의 발현은 무처리군에 비해 LPS를 처리한 군에서 PLW는 20배, OLW는 10배 높았다. PLW, OLW 각각의 처리 농도에서는 iNOS의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다. 최고 농도에서 PLW는 12배, OLW는 15배 증가했다(Figure 7).

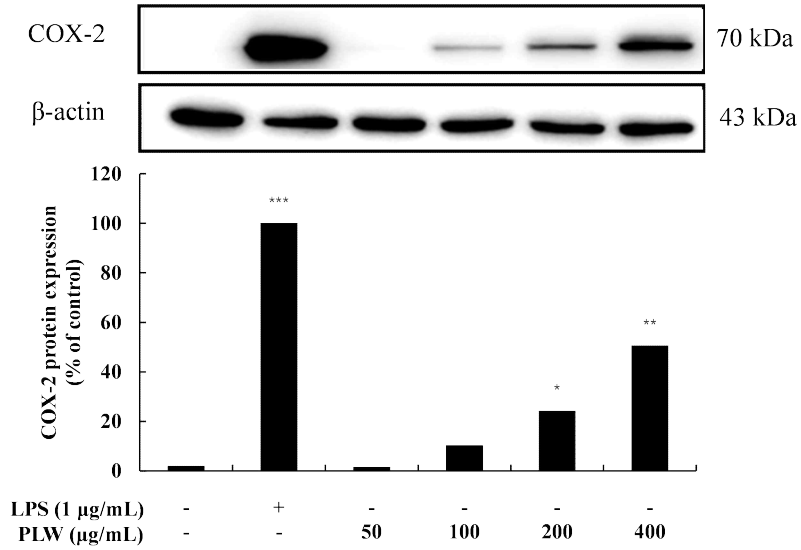


**Figure 7. Effect of (a) PLW, (b) OLW on protein expression of iNOS in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $6.0 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h, and then treated with (a) PLW (50–400 µg/mL), (b) OLW (25–200 µg/mL) for 24 h. The protein expression of iNOS was determined by western blotting.  $\beta$ -actin expression is shown as a loading control. The density values of iNOS are expressed as ratios relative to that of  $\beta$ -actin. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.

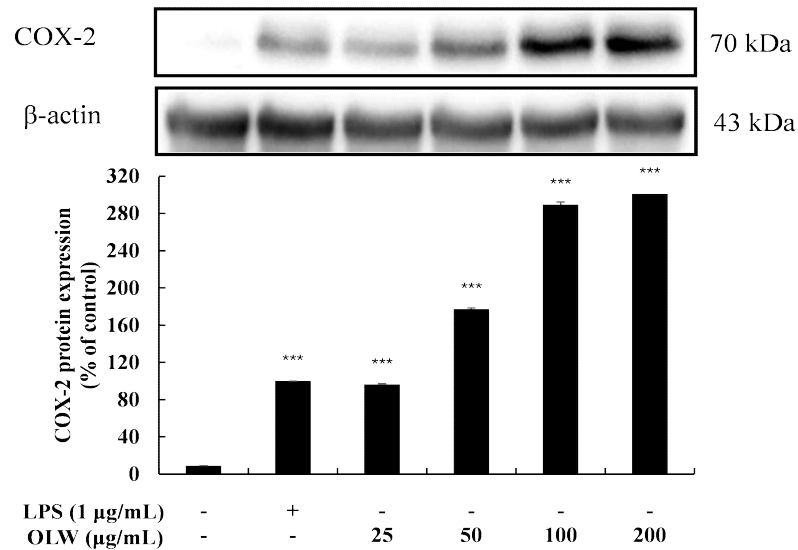
## 5.2. PLW와 OLW의 COX-2 발현에 미치는 효과

RAW 264.7 세포에서 PLW, OLW가 PGE<sub>2</sub> 생성을 증가시킨다는 것을 확인하였다. PGE<sub>2</sub>는 COX-2 단백질의 발현에 의해 합성되므로 COX-2의 발현을 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. COX-2의 발현은 무처리군에 비해 LPS를 처리한 군에서 PLW는 50배, OLW는 11배 높았다. PLW, OLW 각각의 처리 농도에서는 COX-2의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다. 최고 농도에서 PLW는 25배, OLW는 33배 증가했다(Figure 8).

(a)



(b)

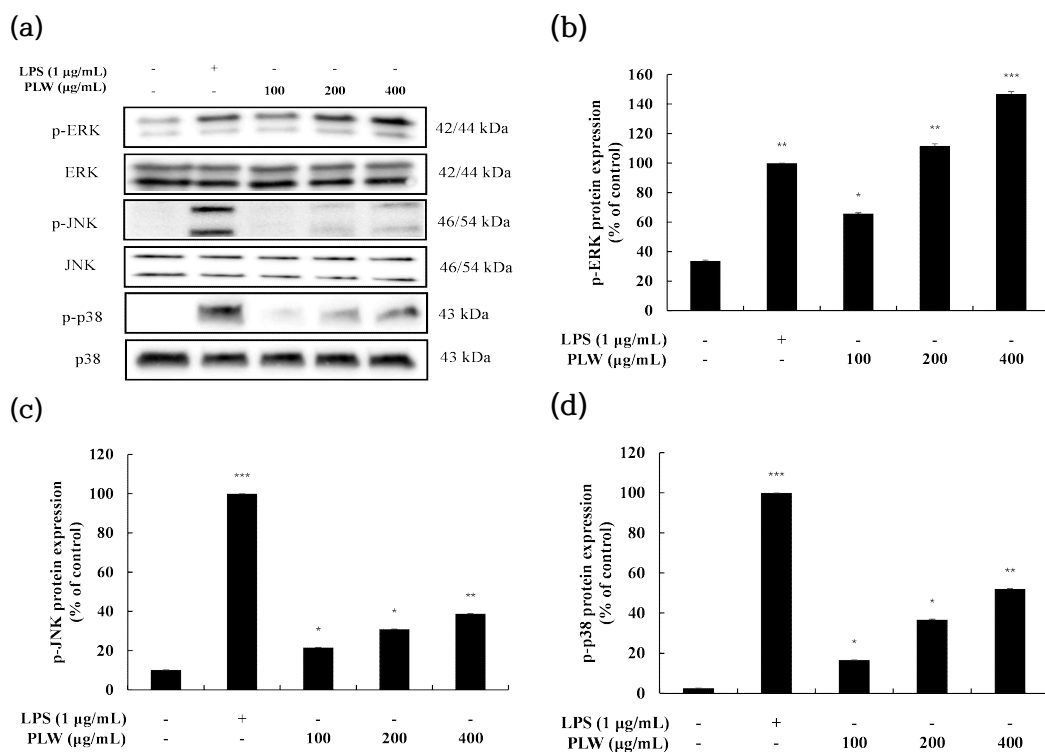


**Figure 8. Effect of (a) PLW, (b) OLW on protein expression of COX-2 in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $6.0 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h, and then treated with (a) PLW (50–400  $\mu$ g/mL), (b) OLW (25–200  $\mu$ g/mL) for 24 h. The protein expression of COX-2 was determined by western blotting.  $\beta$ -actin expression is shown as a loading control. The density values of COX-2 are expressed as ratios relative to that of  $\beta$ -actin. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$  compared with control group.

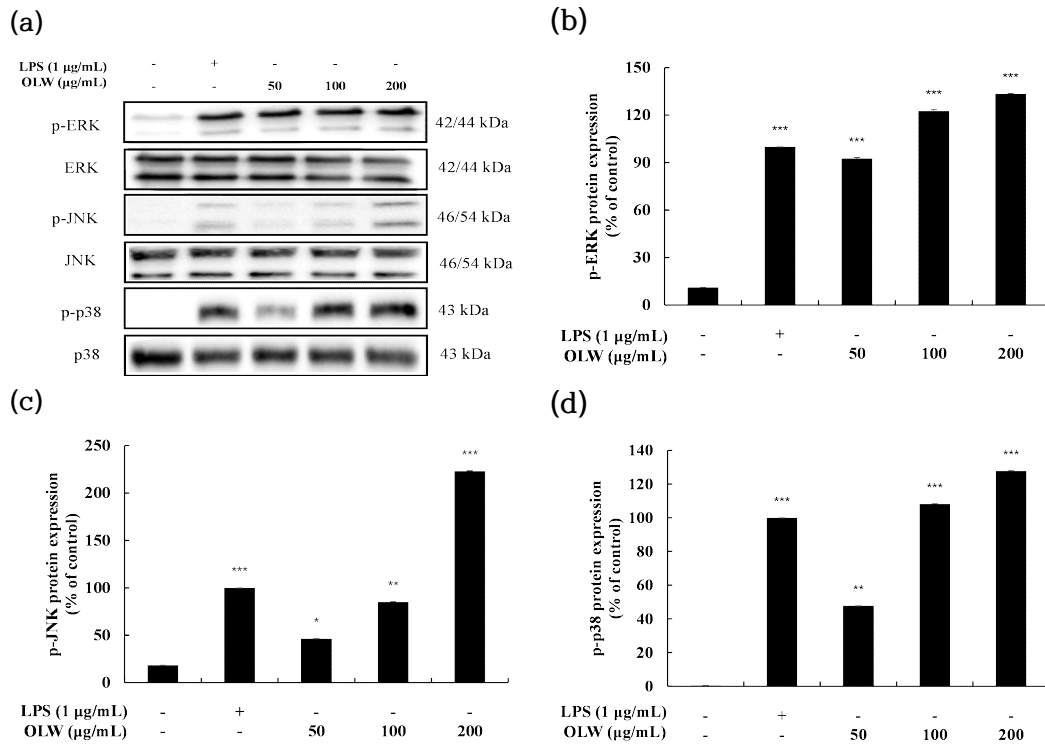
### 5.3. PLW와 OLW의 MAPK 발현에 미치는 효과

PLW, OLW 처리에 의해 MAPK 신호 전달 경로의 변화를 확인하기 위해 Extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38) 단백질의 발현 수준을 확인하였다. ERK, JNK, p38의 인산화 정도를 측정한 결과, PLW 또는 OLW를 처리한 경우 각각의 처리 농도에서 농도 의존적으로 ERK, JNK, p38 모두 인산화가 증가하였다. OLW는 ERK, JNK, p38 모두 강하게 인산화된(Figure 9) 반면, PLW는 JNK, p38과 비교하여 ERK가 강하게 인산화되었다(Figure 10).





**Figure 9.** Effect of PLW on protein expression of MAPK phosphorylation in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $6.0 \times 10^5$  cells/well) were incubated and then treated with PLW (50–400  $\mu\text{g/mL}$ ) for 15 min. (a) The phosphorylation and total protein levels of MAPK ((b) ERK, (c) JNK and (d) p38) were determined by western blotting. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.

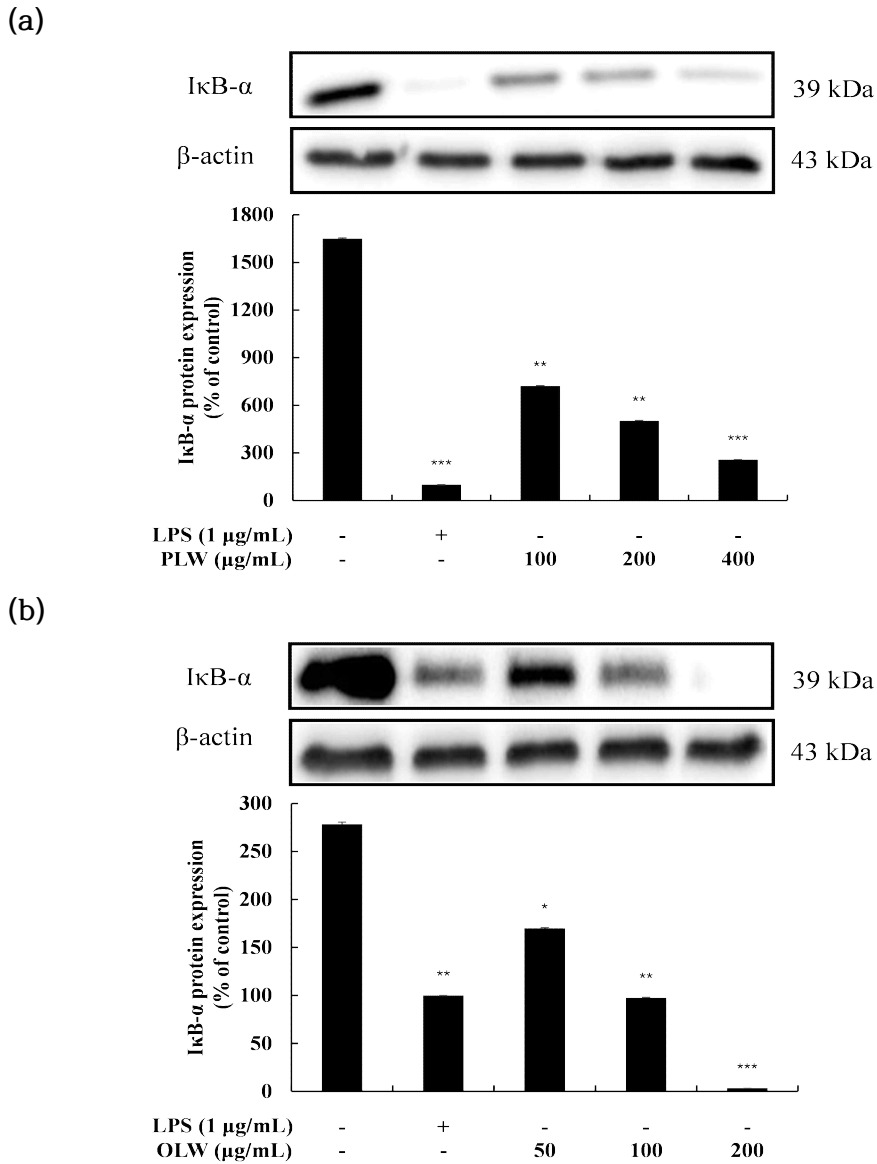


**Figure 10. Effect of OLW on protein expression of MAPK phosphorylation in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $6.0 \times 10^5$  cells/well) were incubated and then treated with OLW (50–200 μg/mL) for 15 min. (a) The phosphorylation and total protein levels of MAPK ((b) ERK, (c) JNK and (d) p38) were determined by western blotting. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.

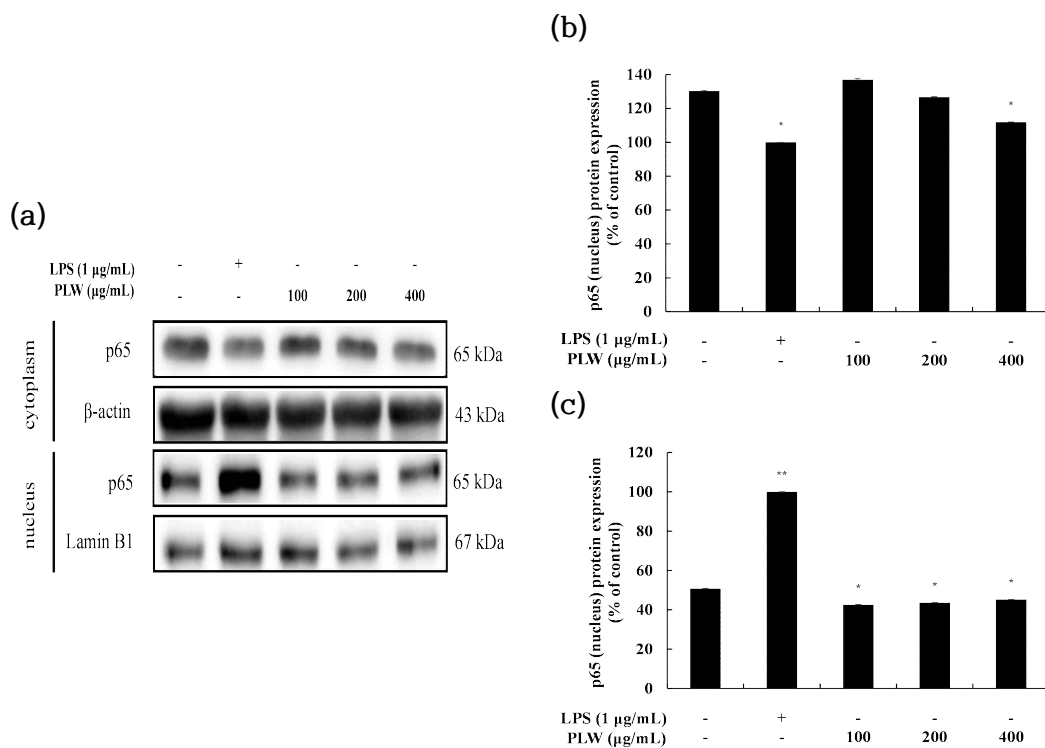
#### 5.4. PLW와 OLW의 NF- $\kappa$ B 발현에 미치는 효과

PLW, OLW 처리에 의해 증가되는 cytokine들의 생성과 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로와의 관계를 분석하였다. LPS를 처리한 군에서의 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해가 무처리군과 비교하여 뚜렷이 나타났다. PLW, OLW만 처리한 군에서는 모두 농도 의존적으로 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해가 나타났다. 이러한 결과는 PLW, OLW가 NF- $\kappa$ B의 활성화를 증가시킨다는 것을 유추해볼 수 있다(Figure 11).

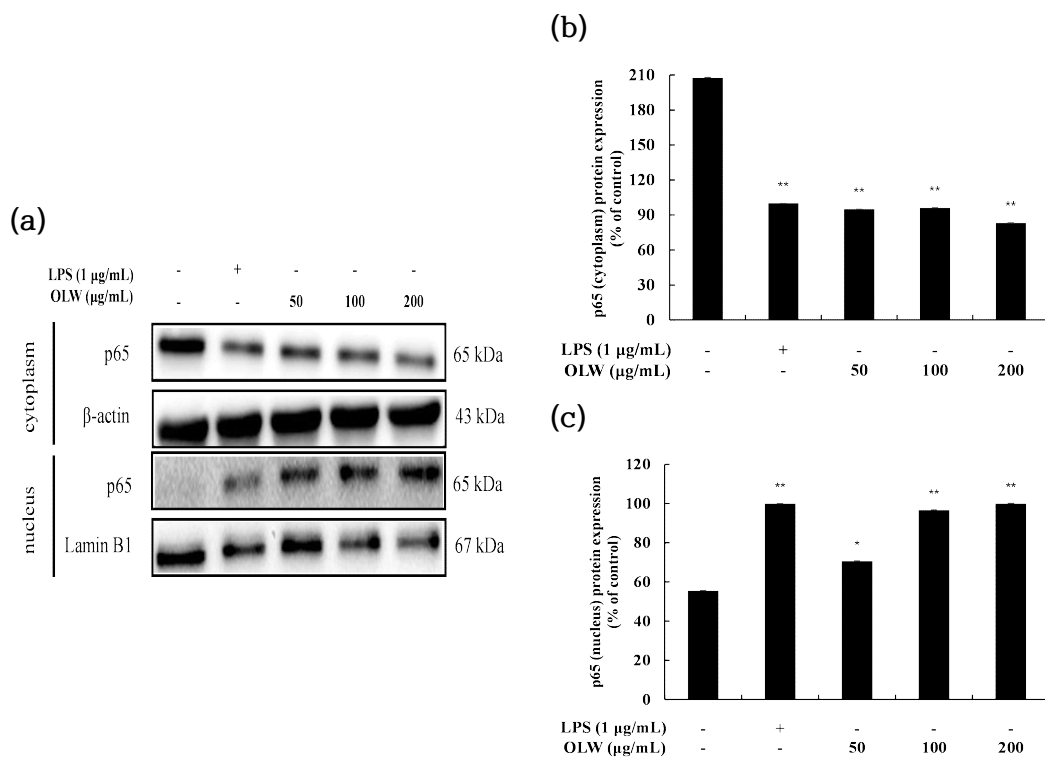
핵과 세포질 단백질을 분리하여 두 유전자의 발현을 단백질 수준에서 비교하였다. 모두 LPS를 처리한 군에서 NF- $\kappa$ B p65의 발현이 세포질에서 감소하고 핵에서 증가하였다. 또한, PLW (12.5-400  $\mu$ g/mL) 및 OLW (6.25-200  $\mu$ g/mL) 각각의 처리 농도에서도 농도 의존적으로 세포질에서 감소하고 핵에서 증가하였다. LPS 및 PLW, OLW 처리에 의해 NF- $\kappa$ B의 핵 내 이동이 이루어졌음을 알 수 있다(Figure 12, 13).



**Figure 11. Effect of (a) PLW, (b) OLW on protein expression of IκB-α in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $6.0 \times 10^5$  cells/well) were incubated and then treated with (a) PLW (50–400 μg/mL), (b) OLW (25–200 μg/mL) for 15 min. The protein levels of IκB-α was determined by western blotting. β-actin expression is shown as a loading control. The density values of IκB-α are expressed as ratios relative to that of β-actin. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.



**Figure 12. Effect of PLW on protein expression of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $6.0 \times 10^5$  cells/well) were incubated and then treated with PLW (50–400  $\mu\text{g/mL}$ ) for 15 min. The (b) nuclear and (c) cytoplasmic protein levels of NF- $\kappa$ B were determined by western blotting.  $\beta$ -actin and Lamin B1 expression is shown as a loading control. The density values of p65 are expressed as ratios relative to that of  $\beta$ -actin and Lamin B1. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.

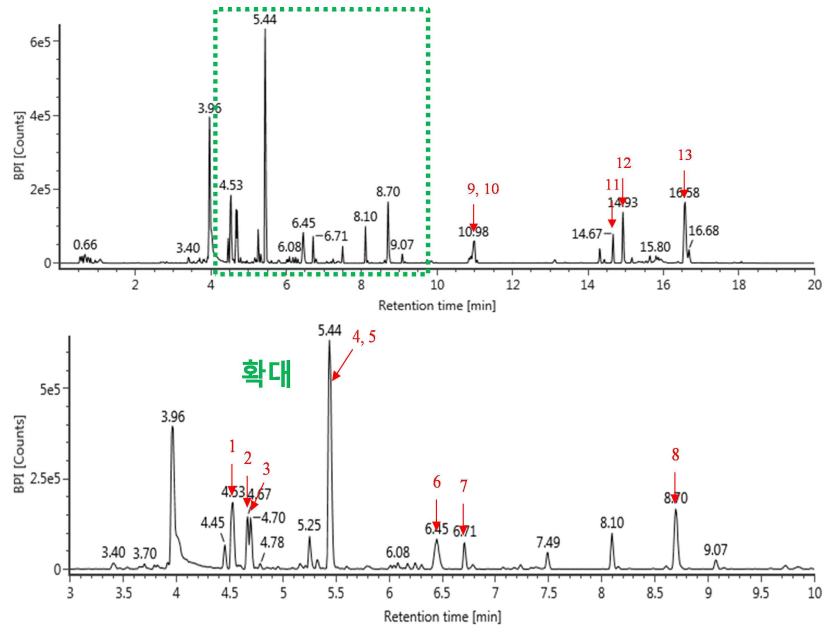


**Figure 13. Effect of OLW on protein expression of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $6.0 \times 10^5$  cells/well) were incubated and then treated with OLW (25–200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 15 min. The (b) nuclear and (c) cytoplasmic protein levels of NF- $\kappa$ B were determined by western blotting.  $\beta$ -actin and Lamin B1 expression is shown as a loading control. The density values of p65 are expressed as ratios relative to that of  $\beta$ -actin and Lamin B1. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  compared with control group.

## 6. 대사산물 분석

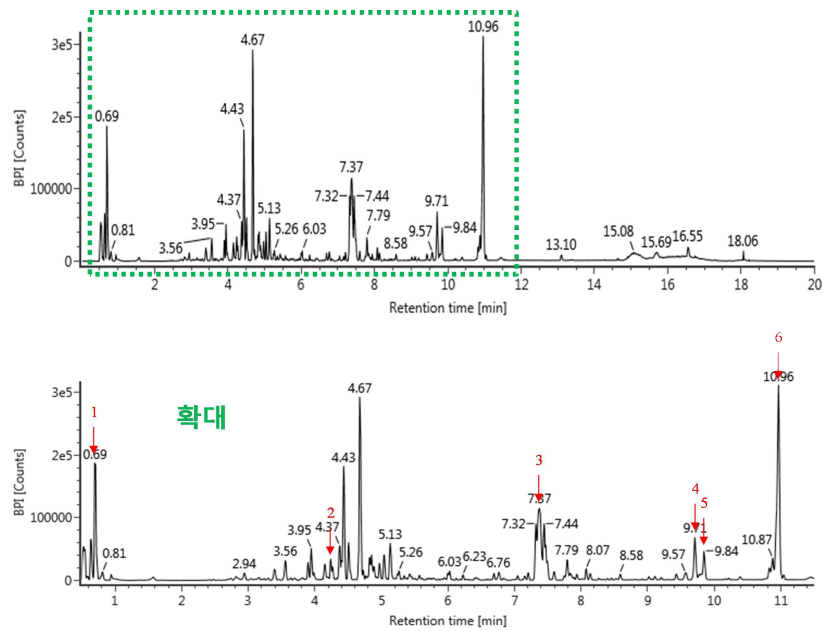
ESI의 positive ion mode, negative ion mode로 PLW의 개별 성분이 분리, 동정 되었다. Figure 14과 Table 2에서 보듯이 PLW는 18종이 확인되었으며 positive ion mode에서 13종, negative ion mode에서 5종이 분리 및 검출되었다. OLW는 4종이 확인되었으며 positive ion mode에서 3종, negative ion mode에서 1종이 분리 및 검출되었다(Figure 15, Table 3).

(a)



- 1, 3-acetyl-2-(2,6-dimethyl-5-heptenyl)oxazolidine; 2, BOC-PHENYLALANINOL; 3, Robinin / clitorin; 4, N,N-Dicyclohexylglycine;
- 5, Carpaine; 6, araguspongine L; 7, N-(1-Benzyl-4-piperidiny)-2-(4-[2-oxo-2-(1-pyrrolidiny)ethyl]-1-piperaziny)acetamide;
- 8, 2-Methyl-2-propanyl (17Z)-14-isobutyl-9-(2-methoxyethyl)-8,13-dioxo-3,9,12-triazaspiro[6.12]nonadec-17-ene-3-carboxylate;
- 9, 12-Phenyldodecanoic acid; 10, Stearidonic acid; 11, Harderoporphyrin; 12, Pheophorbide A; 13, Erucamide

(b)



- 1, Stachyose hydrate; 2, Barlerin; 3, (10E,15Z)-9,12,13-Trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid;
- 4, 9(S)-HpOTrE; 5, 9(S)-HpOTrE; 6, A-12(13)-EpODE

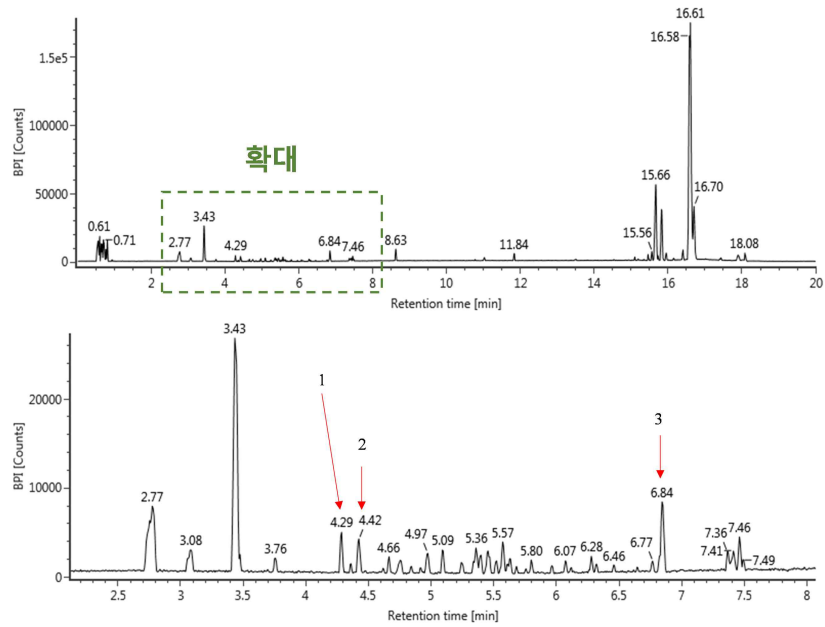
Figure 14. The total ion chromatograms of the PLW by UPLC-Q-TOF MS in (a) positive- and (b) negative-ion modes.



Table 2. Mass data of the nineteen analytes from PLW by UPLC-Q-TOF MS.

Metabolites			Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Mass error (ppm)	Mode
1	1	3-acetyl-2-(2,6-dimethyl-5-heptenyl)oxazolidine	239.1877	240.195	-3.2	Positive
2	2	BOC-PHENYLALANINOL	478.3766	479.3838	-1	Positive
3	3	Robinin / clitorin	239.1882	240.1955	-1.4	Positive
4	4	N,N-Dicyclohexylglycine	251.1517	252.159	-1.7	Positive
5	5	Carpaine	740.2148	741.2221	-2.1	Positive
6	6	araguspongine L	494.3709	495.3782	-2.1	Positive
7	7	N-(1-Benzyl-4-piperidiny)-2-{4-[2-oxo-2-(1-pyrrolidiny)ethyl]-1-piperazinyl}acetamide	276.2084	277.2157	-1.8	Positive
8	8	2-Methyl-2-propanyl (17Z)-14-isobutyl-9-(2-methoxyethyl)-8,13-dioxo-3,9,12-triazaspiro[6.12]nonadec-17-ene-3-carboxylate	276.2084	277.2157	-1.8	Positive
9	9	12-Phenyldodecanoic acid	427.2926	428.2999	-4.9	Positive
10	10	Stearidonic acid	608.2632	609.2704	-0.5	Positive
11	11	Harderoporphyrin	592.2682	593.2755	-0.6	Positive
12	12	Pheophorbide A	507.3662	508.3735	-2.1	Positive
13	13	Erucamide	337.3345	338.3417	0	Positive
14	1	Stachyose hydrate	684.2306	683.2233	-1.8	Negative
15	2	Barlerin	448.1573	447.15	-0.8	Negative
16	3	(10E,15Z)-9,12,13-Trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	328.2242	327.2169	-0.8	Negative
17	4	9(S)-HpOTrE	310.2136	309.2063	-0.8	Negative
18	5	9(S)-HpOTrE	310.2134	309.2061	-1	Negative
19	6	A-12(13)-EpODE	294.2186	293.2113	-0.9	Negative

(a)



(b)

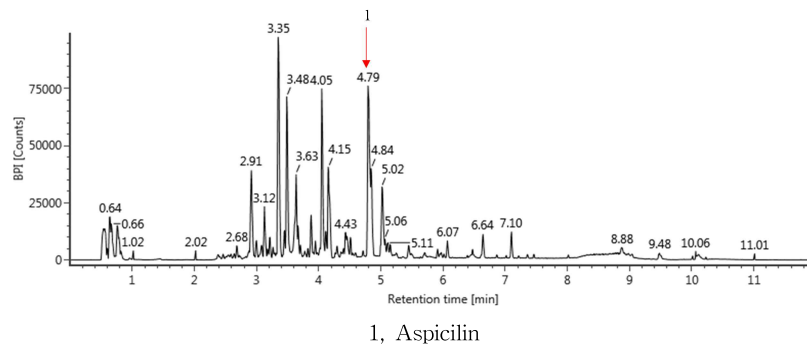


Figure 15. The total ion chromatograms of the OLW by UPLC-Q-TOF MS in (a) positive- and (b) negative-ion modes.

Table 3. Mass data of the four analytes from OLW by UPLC-Q-TOF MS.

Metabolites			Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Mass error (ppm)	Mode
1	1	Riboflavin	376.1381	377.1453	-0.6	Positive
2	2	4-hydroxyheptanophenone / p-tert-Butylphenyl glycidyl ether	206.1307	207.1380	0.3	Positive
3	3	Cannabisin F / heliotropamide	624.2464	625.2537	-1.2	Positive
4	1	Aspicilin	328.2242	327.2170	-2.2	Negative

#### IV. 고찰

인간의 면역 체계는 외부 물질과 병원체에 의한 감염으로부터 보호함으로써 항상성을 유지하고 질병을 예방하는 데 중요한 역할을 한다. 대식세포는 다양한 생물학적 활동을 나타내는 것으로 알려진 중요한 면역 조절 세포이며 숙주 방어, 염증 조절, 조직재형성 등과 관련이 있다. 대식세포의 활성화는 COX-2와 iNOS의 발현을 유도하고, 염증 및 B세포의 분화와 관련된 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 전염증성 cytokine의 생성을 유도한다[44,45].

NO는 산화질소 합성효소(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. NOS는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), and inducible NOS (iNOS)의 3종류가 존재한다. nNOS는 신경세포에서, eNOS는 혈관 내피세포에서 일정하게 발현되는 구성(constitutive) 효소이며, 이와는 대조적으로 iNOS는 면역학적 자극에 반응하여 대식세포에서 발현된다[46-48]. NO는 면역 방어에서 혈압 조절, 혈소판 응집 억제 및 신경 전달에 이르기까지 놀라운 범위의 생리학적 기능을 나타낸다[49-51]. 따라서 PLW와 OLW의 NO 생성 및 iNOS 발현에 영향을 미치는지 알아보았다. RAW 264.7 세포에서 PLW, OLW를 처리한 결과, NO가 농도의존적으로 증가하였으며 western blot을 통해 iNOS의 발현도 증가하였다.

PGE<sub>2</sub>는 체내에서 생성되는 가장 풍부한 PG 중 하나로 동물 중에서 가장 널리 특성화되며 다양한 생물학적 활성을 나타낸다. 생리학적 조건에서 PGE<sub>2</sub>는 면역 반응, 혈압, 위장 완전성 및 생식력 조절과 같은 많은 생물학적 기능의 중요한 매개체이다[52]. 생체 내에 존재하는 다양한 세포로부터 COX라는 효소에 의해 생성된다. COX는 두 종류가 존재하는데, COX-1은 신체 전체에 분포된 많은 세포 유형에서 발현되는 반면 COX-2는 성장인자, 스트레스 또는 cytokine 자극에 대한 반응으로 일시적으로 유도된다[53,54]. 따라서 PLW와 OLW의 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현에 영향을 미치는지 알아보았다. RAW 264.7 세포에서 PLW와 OLW를 처리한 결과, PGE<sub>2</sub>가 농도의존적으로 증가하였으며 western blot을 통해 COX-2의 발현도 증가하였다.

Cytokine은 면역세포가 분비하는 단백질로서 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를

조절하여 염증반응을 매개한다. 염증성 질환의 원인과 치료를 규명하기 위하여 cytokine의 역할은 매우 중요하며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 은 in vitro 및 in vivo 모두에서 염증반응을 조절하는 물질로 대표적인 전염증성 cytokine으로 알려져 있다 [55]. 따라서 RAW 264.7 세포에서 PLW와 OLW의 전염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 ELISA kit를 이용하여 조사하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 PLW 또는 OLW 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하였다. 이러한 결과는 PLW와 OLW 모두에서 면역 반응을 증가시켰음을 확인할 수 있었다.

TLR은 초기 염증반응을 조절하는 것으로 알려져 있고 면역 체계의 활성화를 유도하는 데 중요한 역할을 한다. TLR 계열인 TLR4는 LPS에 의해 인식되고 활성화되며 MAPK 및 NF- $\kappa$ B 경로를 유도할 수 있다[56,57].

MAPK 신호 전달 경로는 활성화된 대식세포의 중요한 조절자인 ERK, p38, JNK로 구성되며 iNOS, COX-2 및 전염증성 cytokine 발현에서 중요한 역할을 한다[58,59]. 따라서 PLW와 OLW의 MAPK 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 western blot을 수행하였으며 PLW와 OLW 모두가 농도 의존적으로 ERK, p38, JNK의 인산화를 증가시켰음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 PLW와 OLW가 MAPK 신호 전달 경로를 통해 iNOS, COX-2 및 전염증성 cytokine의 발현을 유도한다는 것을 보여주고 있다.

NF- $\kappa$ B는 미생물과 바이러스 감염에 대한 숙주 방어 및 염증반응의 핵심 분자이다. 비활성 상태에서 NF- $\kappa$ B는 p50, p65 이중이량체로 구성되며 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 결합된 채로 존재한다. NF- $\kappa$ B가 LPS와 같은 염증 자극에 의해 활성화되면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 유도하여 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해 및 NF- $\kappa$ B 핵 전위를 유도한다[60,61]. 따라서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해와 p65의 핵으로의 전위에 대한 PLW, OLW의 영향을 western blot을 통해 조사했다. 결과적으로 PLW와 OLW 모두 농도 의존적으로 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해가 일어나고 p65의 세포질에서 핵으로의 전위가 나타났다. 이것은 PLW와 OLW의 면역 증진활성에 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로가 관여하고 있음을 보여주고 있는 것이다.

또한 최종적으로 UPLC-Q-TOF-MS 분석을 통하여 PLW와 OLW에 존재하는 flavonoid, alkaloid 등 여러 대사산물을 분석하였다. 그러나 이 대사산물들을 이

용한 면역 활성화에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. 이에 분석된 대사산물들이 면역 활성화에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 PLW와 OLW가 RAW 264.7 세포를 자극하여 활성화시키는 면역 활성화 인자로 작용할 수 있다는 것을 다양한 방법으로 증명하였으며, 이러한 면역활성 증진 효과에 MAPK 및 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로가 관여함을 검증하였다 (Figure 16, 17). 그러므로 PLW와 OLW가 면역활성 증진효과를 가진 천연소재로 개발이 가능할 것으로 제안한다.

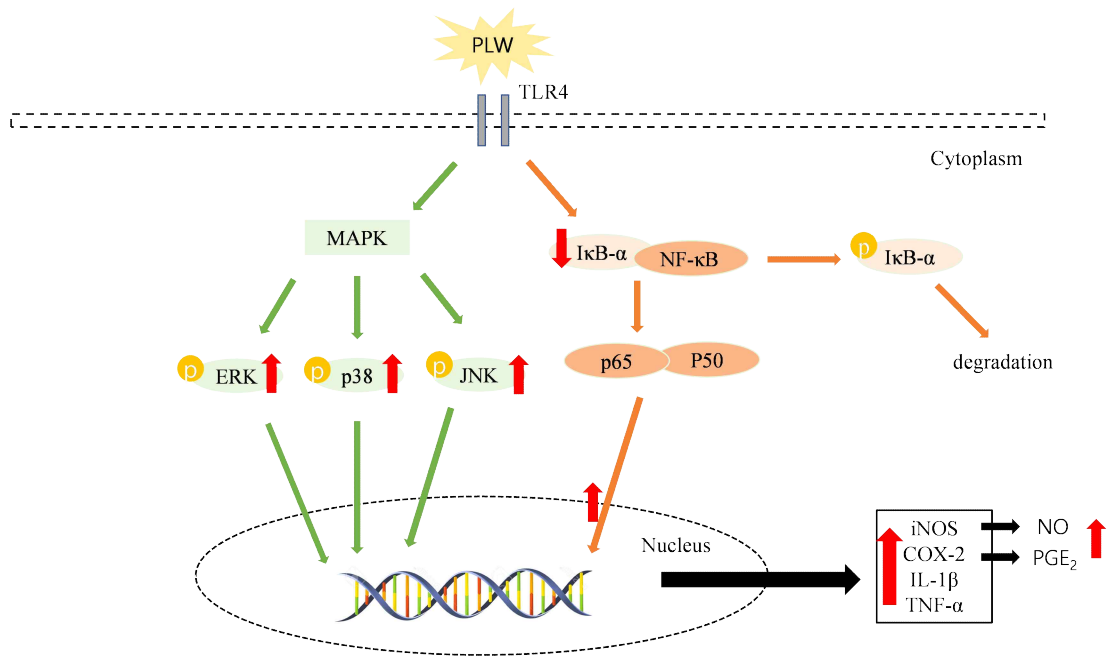


Figure 16. The possible molecular mechanisms of immunomodulatory activity of PLW.

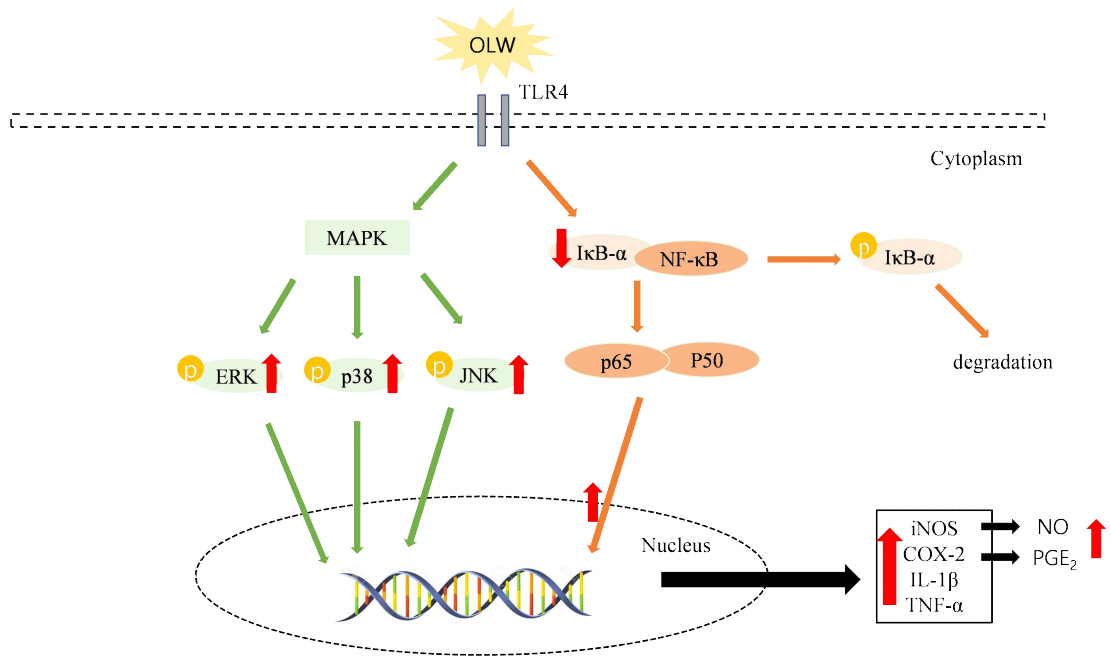


Figure 17. The possible molecular mechanisms of immunomodulatory activity of OLW.



## V. 참고문헌

1. Tetteh JNA, Nguyen VK, Hernandez-Vargas EA. Network models to evaluate vaccine strategies towards herd immunity in COVID-19. *Journal of Theoretical Biology*, 2021, 531.
2. Anggriani N, Ndi MZ, Amelia R, Suryaningrat W, Aji Pratama MA. A mathematical COVID-19 model considering asymptomatic and symptomatic classes with waning immunity. *Alexandria Engineering Journal*, 2022, 61(1), 113-124.
3. Husaini AM, Jan KN, Wani GA. Saffron; A potential drug-supplement for severe acute respiratory syndrome coronavirus (COVID) management. *Heliyon*, 2021, 7(5).
4. Alhazmi HA, Najmi A, Javed SA, Sultana S, Al Bratty M, Makeen HA, Meraya AM, Ahsan W, Mohan S, Taha MME, Khalid A. Medicinal Plants and Isolated Molecules Demonstrating Immunomodulation Activity as Potential Alternative Therapies for Viral Diseases Including COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12.
5. Wahab S, Ahmad I, Irfan S, Baig MH, Farouk AE, Dong JJ. Use of Natural Compounds as a Potential Therapeutic Agent Against COVID-19. *Current Pharmaceutical Design*, 2021, 27(9), 1144-1152.
6. Jung JI, Kim JM, Kim HS, Kim HS, Kim EJ. Immunostimulatory Effect of Wild-Cultivated Ginseng Extract via the Increase in Phagocytosis and Cytokine Secretions in RAW264.7 Macrophages. *Journal of the Korean*

*Society of Food Science and Nutrition*, 2019, 68(6), 686–691.

7. Wei M, Geng L, Wang Q, Yue Y, Wang J, Wu N, Wang X, Sun C, Zhang Q. Purification, characterization and immunostimulatory activity of a novel exopolysaccharide from *Bacillus* sp. H5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 189, 649–656.
8. Son HJ, Eo HJ, Park GH, Jeong JB. *Heracleum moellendorffii* root extracts exert immunostimulatory activity through TLR2/4-dependent MAPK activation in mouse macrophages, RAW264.7 cells. *Food Science & Nutrition*, 2020, 9(1), 514–521.
9. Um YR, Eo HJ, Kim HJ, Kim KY, Jeon KS, Jeong JB. Wild simulated ginseng activates mouse macrophage, RAW264.7 cells through TLR2/4-dependent activation of MAPK, NF- $\kappa$ B and PI3K/AKT pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 263.
10. Cho YC, Kim HJ, Kim YJ, Lee KY, Choi HJ, Lee IS, Kang BY. Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN- $\gamma$  and LPS-activated macrophages. *International Immunopharmacology*, 2008, 8(4), 567–573.
11. Wang J, Wang H, Zhang H, Liu Z, Ma C, Kang W. Immunomodulation of ADPs-1a and ADPs-3a on RAW264.7 cells through NF- $\kappa$ B/MAPK signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132, 1024–1030.
12. Jia H, Liu S, Wu J, Hou S, Xin T, Guo X, Yuan W, Gao X, Zhang G, Li M, Qu H, Zhu H. Recombinant TB9.8 of *Mycobacterium bovis* Triggers

the Production of IL-12 p40 and IL-6 in RAW264.7 Macrophages via Activation of the p38, ERK, and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *Inflammation*, 2015, 38(3), 1337-1346.

13. Li JY, Liu Y, Gao XX, Gao X, Cai H. TLR2 and TLR4 signaling pathways are required for recombinant *Brucella abortus* BCSP31-induced cytokine production, functional upregulation of mouse macrophages, and the Th1 immune response in vivo and in vitro. *Cellular & Molecular Immunology*, 2014, 11(5), 477-494.
14. Liu S, Jia H, Hou S, Zhang G, Xin T, Li H, Yuan W, Guo X, Gao X, Li M, Wu J, Zhu H. Recombinant TB10.4 of *Mycobacterium bovis* induces cytokine production in RAW264.7 macrophages through activation of the MAPK and NF- $\kappa$ B pathways via TLR2. *Molecular Immunology*, 2014, 62(1), 227-34.
15. Kuo MC, Weng CY, Ha CL, Wu MJ. *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF- $\kappa$ B. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 103(2), 217-22.
16. Ren Z, Cui J, Huo Z, Xue J, Cui H, Luo B, Jiang L, Yang R. Cordycepin suppresses TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation by reducing p65 transcriptional activity, inhibiting I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, and blocking IKK $\gamma$  ubiquitination. *International Immunopharmacology*, 2012, 14(4), 698-703.
17. Jun YJ, Kim JH, Jin BS. Development and Characterization of O/W Cosmetic Formulations Containing Nipa palm (*Nypa fruticans* Wurmb) and Finger root (*Boesenbergia pandurata*) Extracts. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 2021, 38(4), 922-930.

18. Jeong US, Kin SS, Chae YW. Analysis on the Cultivation Trends and Main Producing Areas of Subtropical Crops in Korea. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, 2020, 21(12), 524-535.
19. Kim CY, Kim YH, Han SH, Ko HC. Current Situations and Prospects on the Cultivation Program of Tropical and Subtropical Crops in Korea. *Korean Journal of Plant Resources*, 2019, 32(1), 45-52.
20. Hyun SB, Hyun CG. Antioxidant Activity and Skin Safety of Jeju Pineapple Guava (*Acca Sellowiana*). *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 2020, 35(3), 221-227.
21. Sharma A, Bachheti A, Sharma P, Bachheti RK, Husen A. Phytochemistry, pharmacological activities, nanoparticle fabrication, commercial products and waste utilization of *Carica papaya* L.: A comprehensive review. *Current Research in Biotechnology*, 2020, 2, 145-160.
22. Nguyen TT, Shaw PN, Parat MO, Hewavitharana AK. Anticancer activity of *Carica papaya*: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2013, 57(1), 153-164.
23. Vuong QV, Hirun S, Chuen TLK, Goldsmith CD, Murchie S, Bowyer MC, Phillips PA, Scarlett CJ. Antioxidant and anticancer capacity of saponin-enriched *Carica papaya* leaf extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 50(1), 169-177.
24. Romasi EF, Karina J, Parhusip AJN. Antibacterial Activity of Papaya Leaf

Extracts Against Pathogenic Bacteria. *Makara Journal of Technology*, 2011, 15(2), 173-177.

25. Anibijuwon II, Udeze AO. Antimicrobial Activity of Carica Papaya (Pawpaw Leaf) on Some Pathogenic Organisms of Clinical Origin from South-Western Nigeria. *Ethnobotanical Leaflets*, 2009, 7(4), 850-864.
26. Owoyele BV, Adebukola OM, Funmilayo AA, Soladoye AO. Anti-inflammatory activities of ethanolic extract of Carica papaya leaves. *Inflammopharmacology*, 2008, 16(4), 168-73.
27. Bere AW, Mulati O, Kimotho J, Ng'ong'a F. Carica papaya Leaf Extract Silver Synthesized Nanoparticles Inhibit Dengue Type 2 Viral Replication In Vitro. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(8).
28. Ayuba V, Ansari RA, Ogbonnaya E, Rabiou KM, Kalu AA. Anti-diabetic Potential of Methanol Extract of Leaves of Selected Medicinal Plant. *South Asian Research Journal of Natural Products*, 2021, 4(1), 34-39.
29. Seo SA, Ngo HTT, Hwang E, Park B, Yi TH. Protective effects of Carica papaya leaf against skin photodamage by blocking production of matrix metalloproteinases and collagen degradation in UVB-irradiated normal human dermal fibroblasts. *South African Journal of Botany*, 2020, 131, 398-405.
30. Prasetya AT, Mursiti S, Maryan S, Jati NK. Isolation and Identification of Active Compounds from Papaya Plants and Activities as Antimicrobial. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2018, 349.

31. Sherwani SK, Bokhari TZ, Nazim K, Gilani SA, Kazmi SU. Qualitative phytochemical screening and antifungal activity of *Carica papaya* leaf extract against human and plant pathogenic fungi. *International Research Journal of Pharmacy*, 2013, 4(7), 83-86.
32. Nugroho A, Heryani H, Choi JS, Park HJ. Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017, 7(3), 208-213.
33. Ahn YK, Seong KC, Kim SH. Effect of Different Sowing Time on the Yield and Plant Growth for Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) Production. *Journal of Bio-Environment Control*, 2012, 21(3), 267-270.
34. Islam MT. Phytochemical information and pharmacological activities of Okra (*Abelmoschus esculentus*): A literature-based review. *Phytotherapy Research*, 2018, 33(1), 72-80.
35. Liao Z, Zhang J, Liu B, Yan T, Xu F, Xiao F, Wu B, Bi K, Jia Y. Polysaccharide from Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) Improves Antioxidant Capacity via PI3K/AKT Pathways and Nrf2 Translocation in a Type 2 Diabetes Model. *Molecules*, 2019, 24(10).
36. Onuora EEO, Okafor CN. Efficacy of Extracts of African Eggplant and Okra Leaves on Alloxan-Induced Diabetes Mellitus Adult Male Albino Rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2016, 15(6), 551-555.
37. Khosrozadeh M, Heydari N, Abootalebi M. The Effect of *Abelmoschus Esculentus* on Blood Levels of Glucose in Diabetes Mellitus. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 2016, 41(3).

38. Olawuyi IF, Lee WY. Structural characterization, functional properties and antioxidant activities of polysaccharide extract obtained from okra leaves (*Abelmoschus esculentus*). *Food Chemistry*, 2021, 354.
39. Durazzo A, Lucarini M, Novellino E, Souto EB, Daliu P, Santini A. *Abelmoschus esculentus* (L.): Bioactive Components' Beneficial Properties-Focused on Antidiabetic Role-For Sustainable Health Applications. *Molecules*, 2018, 24(1).
40. Caluête MEE, Souza LMP, Ferreira ES, Franca AP, Gadelha CAA, Aquino JS, Santi-Gadelha T, Nutritional, antinutritional and phytochemical status of okra leaves (*Abelmoschus esculentus*) subjected to different processes. *African Journal of Biotechnology*, 2015, 14(8), 683-687.
41. BOYRAZ MÜ, SHEKHANY B, SÜZERGÖZ F. Cellular Imaging Analysis of MTT Assay Based on Tetrazolium Reduction. *Journal of Harran University Medical Faculty*, 2021, 18(1), 95-99.
42. Chakrabarti R, Kundu S, Kumar S, Chakrabarti R. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2000, 80(1), 133-138.
43. Sládková T, Kostolanský F. The role of cytokines in the immune response to influenza A virus infection. *Acta Virologica*, 2006, 50(3), 151-162.
44. Monmai C, Jang AY, Kim JE, Lee SM, You S, Kang S, Park WJ. Immunomodulatory Activities of Body Wall Fatty Acids Extracted from *Halocynthia aurantium* on RAW264.7 Cells. *Journal of Microbiolog and*

*Biotechnology*, 2020, 30(12), 1927-1936.

45. Monmai C, Rod-In W, Jang AY, Lee SM, Jung SK, You S, Park WJ. Immune-enhancing effects of anionic macromolecules extracted from *Codium fragile* coupled with arachidonic acid in RAW264.7 cells. *PLOS ONE*, 2020, 15(10).
46. Kim SY, Heo SH, Kim SH, Kwon MJ, Park SA, Yoon HS. Dehydrocostus Lactone Suppresses the Expression of iNOS Induced by TLR Agonists. *Biomedical Science Letters*, 2019, 25(3), 267-274.
47. Jung HJ, Kim YS, Kim GJ. Effects of Armeniacae Semen and Amygdalin on Prostaglandin E2 Synthesis and Nitric Oxide Production. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, 2019, 32(3), 13-22.
48. Kim DK, Jang TJ. The Immunohistochemical Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Rat Hippocampus after Pentylene-tetrazole-Induced Seizures. *Journal of the Korean Pediatric Society*, 2001, 44(12), 1432-1440.
49. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 2007, 15(6), 252-259.
50. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2007, 51(3), 443-452.
51. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells



and Its Role in Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12).

52. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011, 31(5), 986-1000.
53. Medeiros A, Peres-Buzalaf C, Fortino Verdán F, Serezani CH. Prostaglandin E<sub>2</sub> and the Suppression of Phagocyte Innate Immune Responses in Different Organs. *Mediators of Inflammation*, 2012.
54. Tang T, Scambler TE, Smallie T, Cunliffe HE, Ross EA, Rosner DR, O'Neil JD, Clark AR. Macrophage responses to lipopolysaccharide are modulated by a feedback loop involving prostaglandin E<sub>2</sub>, dual specificity phosphatase 1 and tristetraproline. *Scientific Reports*, 2017, 7(1).
55. Kim MJ, Lee JY, Kim SS, Seong KC, Lim CK, Park KJ, An HJ, Choi YH, Kim SY, Hyun CG. Anti-inflammatory activities of *Olea europaea* extracts from Jeju Island on LPS-induced RAW 264.7 cells. *Korean Journal of Food Preservation*, 2018, 25(5), 557-563.
56. Wang X, Jiang X, Deng B, Xiao J, Jin J, Huang Z. Lipopolysaccharide and palmitic acid synergistically induced MCP-1 production via MAPK-mediated TLR4 signaling pathway in RAW264.7 cells. *Lipids in Health and Disease*, 2019, 18(1).
57. Park J, Ha SH, Abekura F, Lim H, Magae J, Ha KT, Chung TW, Chang YC, Lee YC, Chung E, Ku J, Kim CH. 4-O-Carboxymethylascoclorin Inhibits Expression Levels of on Inflammation-Related Cytokines and Matrix Metalloproteinase-9 Through NF- $\kappa$ B/MAPK/TLR4 Signaling

Pathway in LPS-Activated RAW264.7 Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10.

58. Guo Q, Bi D, Wu M, Yu B, Hu L, Liu C, Gu L, Zhu H, Lei A, Xu X, Wang J. Immune activation of murine RAW264.7 macrophages by sonicated and alkalized paramylon from *Euglena gracilis*. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1).
59. Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, He Y, Liu J, Zhang ZJ, Sun J, Lu D. Resveratrol Inhibits LPS-Induced MAPKs Activation via Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Murine RAW 264.7 Macrophage Cells. *PLOS ONE*, 2012, 7(8).
60. Intayoung P, Limtrakul P, Yodkeeree S. Antiinflammatory Activities of Crebanine by Inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 Activation through Suppressing MAPKs and Akt Signaling in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39(1), 54-61.
61. Sun P, Song SZ, Jiang S, Li X, Yao YL, Wu YL, Lian LH, Nan JX. Salidroside Regulates Inflammatory Response in Raw 264.7 Macrophages via TLR4/TAK1 and Ameliorates Inflammation in Alcohol Binge Drinking-Induced Liver Injury. *Molecules*, 2016, 21(11).