P - 302

가시오가피와 더덕 추출물을 첨가한 발효유가 마우스의 면역 기능에 미치는 영향

임상동* · 김기성 · 성기승 · 심진아 · 한동운[1]

한국식품연구원, [1]천안연암대학

서 론

가시오가피는 1969년 Brekmann에 의해 분리된 eleutheroside 류가 adaptogen으로서의 효능, 즉 외부의 스트레스에 의한 생체의 적응력 및 피로 회복에 탁월한 활성이 있는 것으로 보고된 이래 인삼과 함께 중요한 생약제로 연구대상이 되고 있다. 가시오가피는 근피나 수피의 추출물은 강장제로서 기관지 천식 치료제, 체력 증강, 근골격 증진, 항암, 항노화, 항피로, 이러한 효과는 주로 lignan과 iridoid glycoside 류에 의해서 생성되는 것으로 알려져 있고(Hirata *et al*, 1996) isofraxidin에는 이담작용이 있는 것으로 보고되어 있다. Ovodov 등(1971)은 뿌리껍질에서 eleutheroside A, B, B_1, C, D 및 E 등의 saponin 및 lignan glycoside를 분리 보고하여 이들 성분은 인삼의 약리활성과 유사한 효과를 보고한 바 있다. 한편, 더덕(*Codonopsis lanceolata* Bentham et Hooker)은 도라지과(Companulaceae)에 속하는 다년생 만초로서 뿌리를 양유(Radix Codonopais lanceolatae)라 하며 모양은 비대하고 방추형을 하고 있다(신, 1986). 더덕의 성분으로는 sterol, triterpenoid(Yang *et al.*, 1975), cyckoartenol(Chung *et al.*, 1976), N-formylharman, 1-carbomethoxy-β-carboline, perlolynine, norharman(Chang *et al.*, 1986) 및 휘발성 향기 성분들이 있고 혈청 지질의 감소(Park *et al.*, 1989), 항산화 효과(Lee *et al.*, 1993) 및 흉선 세포의 증식과 면역 증강 효과(Maeng et al, 1991) 등의 약리 작용이 있는 것으로 보고되어 있다. 이에 본 연구에서는 가시오가피와 더덕의 협동작용으로 효과를 높이고 발효유에 응용 가능성을 검토하기 위하여 농도별로 첨가한 발효유를 제조하여 면역 증강 효능을 가지고 복용에도 편리한 가시오가피 첨가 발효유를 개발할 목적으로 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시료 조제 및 사육 조건

본 실험에 사용한 더덕과 가시오가피 줄기(북한산)는 서울 경동시장에서 구입하였고, 가시오가피(줄기)와 더덕은 각각 잘게 썰은 다음 가수량을 무게비 1 : 5의 비율로 넣고 100℃에서 2시간 동안 열탕 추출하였다. 추출액은 감압 농축 과정을 거쳐 동결 건조하였다.

발효유 제조는 원유 96.15%와 탈지 분유 3.85%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 30분간 살균하고, 40℃로 냉각시킨 다음 ABT-C(*Lactobacillus acidophilus,*

*Bifidobacterium longum, Streptococcus thermophilus*로 구성된 혼합 균주, Groupe Rhone-poulenc) 상업 균주를 0.2%(w/w)접종하고, 최종 pH 4.3으로 감소할 때까지 배양한 다음 가시오가피 건조 추출물을 첨가하여 발효유를 제조하였다. 실험에 사용된 동물은 한림실험동물에서 생후 35일령 평균 체중 20g인 SPF ICR 마우스 수컷 60마리를 임의로 12마리씩 5군으로 나누어 총 10주 동안 실험 식이를 급여하여 사육하였다.

2. 투여량 선정 및 투여 방법

면역 활성 증진 효과를 알아보기 위하여 선발된 수컷 마우스를 대상으로 하여 발효유에 가시오가피와 더덕 열수 추출 건조물(가시오가피 : 더덕 = 8 : 2)을 혼합하여 투여한 그룹 1mg/mL(A), 3mg/mL(B), 9mg/mL(C)의 3그룹으로 나누어 임상적용 경로인 경구 투여를 선택하여 발효유를 각각 3 mL/kg씩 위내로 직접 투여하였다. 대조군은 발효유만 먹인 그룹(D)과 식염수만 먹인 그룹(E)을 두었다. 시료 용량은 시판되고 있는 드링크 발효유 150mL/성인 체중 60kg을 1일 기준으로 결정하였다.

3. 분석 방법

장기 중량 및 크기 측정은 시험 기간 중 폐사한 동물이나 시험 종료 후 모든 생존 동물에 대하여 ehter 마취후 채혈하고 안락사 시킨 다음 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 모든 시험 동물은 비장과 흉선을 포함하여 간장, 신장(좌우), 폐장, 심장, 고환(수컷:좌우) 등의 절대장기 중량 및 체중에 대한 상대 장기 중량을 측정하였다. 혈중 면역글로불린 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고 후 원심 분리 (3,000rpm, 30min)하여 얻은 혈청에 대해서 albumin, globulin, total protein 치를 측정하였다. 양적혈구에 대한 항체 생산세포 측정은 양적혈구에 대한 Jern's plaque assay method를 다소 수정하여 실시하였다(Gilbert *et al.*, 1983). 양적혈구(SRBC)에 대한 응집소가 측정(AGG test)은 microtitration tray의 각혈에 56℃에서 30분간 비동화 시킨 혈청에 동량의 0.5% SRBC 부유액을 혼합하여 37℃에서 1시간 방치한 다음 응집을 일으킨 혈청의 최고 희석도를 항체가로 판독하였다. 백혈구 백분율 계산은 wright' stain을 이용하였고 각각의 식이군에서 비장의 여포 변연부의 크기 및 배 중심의 형성 정도를 비교하기 위해 절제된 비장 조직을 10% formalin 용액에 1주 이상 충분히 고정시킨 후 모든 장기조직은 파라핀 포매기(Leica, vaccum infiltration Processor)에 포매하여 초박절편기(Microtom, Leica)로 2~3μm 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin stain으로 염색하여 광학현미경하에서 검경하였다.

4. 통계 처리

실험결과는 SAS package를 이용하여 실험군당 Mean±SD로 표시하였고, 실험군간 통계적인 유의성은 *t*-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 식이 섭취량 및 체중 변화

실험 기간에 따른 체중 변화를 보면 동일 기간내에 실험군의 평균 체중은 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실험에 사용한 가시오가피와 더덕 함유 발효유가 마우스의 체중에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다.

2. 장기 무게 측정

전체 실험 기간 중 간 무게는 대조군에 비해서 B,C 군에서는 상대적으로 낮았다. 그러나 전체적으로 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 보이지 않음에 따라 가시오가피와 더덕 첨가 발효유의 급여는 체중이나 장기의 무게에 유의할만한 변화를 유발하지 않는 것으로 생각된다. 비장 무게는 7주령에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 10주령에서는 C군에서 유의성 있게 증가하여 비장 계수(spleen index)의 유의성 있는 증가가 관찰되었다($P<0.05$) (Table 1).

3. 양적혈구(SRBC)에 대한 항체생산세포 측정(PFC test)

양적혈구에 대한 항체 생산세포수 측정 결과는 각 식이군에서 7주, 10주 사이를 두고 연령에 따른 일정한 양상을 보이고 있다(Fig. 1). 즉 식이 지속 기간이 길어질수록 모든 군에서 현저하게 감소되었다. 이것은 나이가 들수록 생체내 T-helper cell과 B-cell이 감소되어 체액성 면역이 떨어진다는 보고와 일치하는 결과를 보였다(Richar *et al.*, 1986).

4. 양적혈구(SRBC)에 대한 적혈구 응집소가 측정

실험 식이 마우스의 전반적인 면역 기능 상태를 확인하기 위하여 양적혈구 항원에 대한 적

Table 1. Lymphatic organ weight and index changes of ICR mice fed experimental diets(g/mice)

Group	Weeks	Spleen	Spleen index	Thymus	Thymus index
A	7	0.28±0.04^{b}	0.85±0.12^{b}	0.12±0.01^{b}	0.38±0.04^{b}
	10	0.31±0.10^{b}	0.94±0.40^{b}	0.15±0.08^{b}	0.43±0.20^{b}
B	7	0.27±0.10^{b}	0.64±0.35^{b}	0.11±0.05^{b}	0.27±0.18^{b}
	10	0.21±0.07^{b}	0.56±0.16^{b}	0.15±0.15^{b}	0.39±0.39^{b}
C	7	0.26±0.08^{b}	0.83±0.23^{b}	0.10±0.04^{b}	0.32±0.11^{b}
	10	0.36±0.11^{a}	1.14±0.37^{a}	0.13±0.07^{b}	0.39±0.15^{b}
D	7	0.31±0.15^{b}	1.04±0.74^{b}	0.13±0.05^{b}	0.41±0.17^{b}
	10	0.29±0.08^{b}	0.88±0.38^{b}	0.14±0.61^{b}	0.37±0.12^{b}
E	7	0.22±0.06^{b}	0.62±0.20^{b}	0.11±0.02^{b}	0.30±0.06^{b}
	10	0.50±0.43^{b}	1.45±1.33^{b}	0.16±0.12^{b}	0.43±0.27^{b}

[1] Values are mean±S.D.(n=6)

[2] Spleen index = spleen wt.×100÷body wt.

[3] Thymus index = thymus wt.×100÷body wt.

[a~b] Values with different letters are significantly different at $P<0.05$ by t-test.

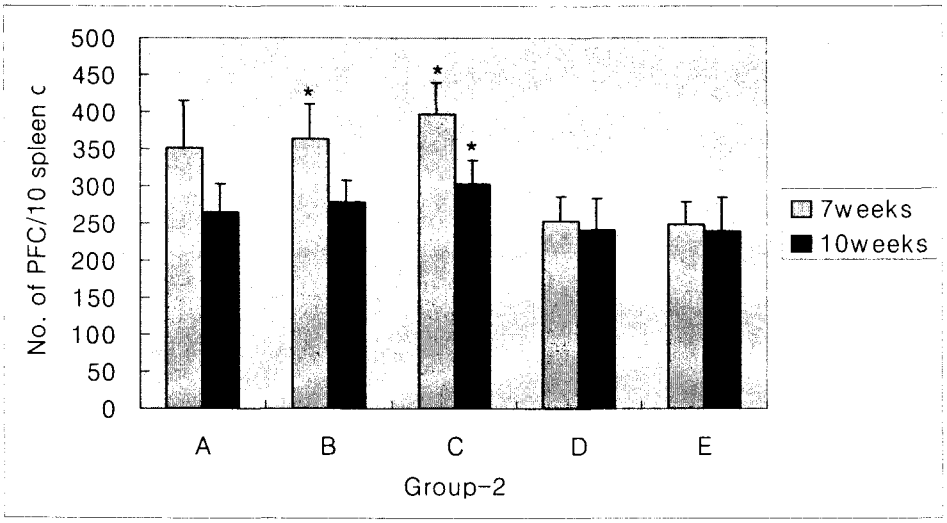


Fig. 1. Plaque forming cell test to sheep red blood cells of mice fed experimental diets (No of PFC/10 spleen cell).

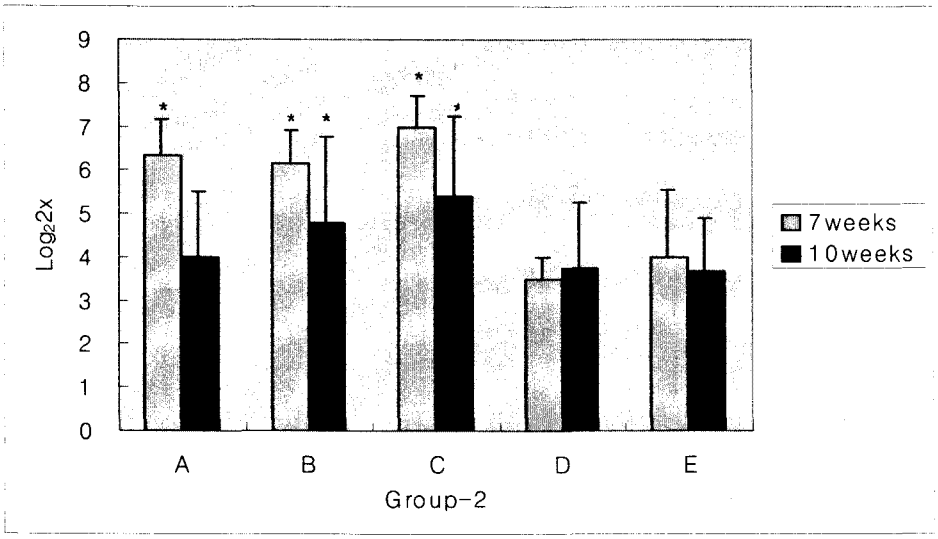


Fig. 2. Antibody response to SRBC in ICR mice fed experimental diets.

혈구 응집소가를 측정한 결과(Fig. 2) 실험식이 투여군인 A~C군 모두 대조군에 비하여 높은 응집소가를 보였고, 7주차에는 A, B, C군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었다.

5. 혈중 면역글로불린(IgG) 검사

혈중 면역글로불린(IgG)의 수치는 7주에서는 B, C군에서 증가하였고 C군에서는 대조군에 비하여 유의성이 있었으며, A, B, C군 7, 10주령에서는 농도 의존적으로 증가하는 소견을 보여 가시오가피와 더덕의 함유가 면역 글로불린의 형성에도 도움을 주는 것으로 사료되었다(Fig. 3).

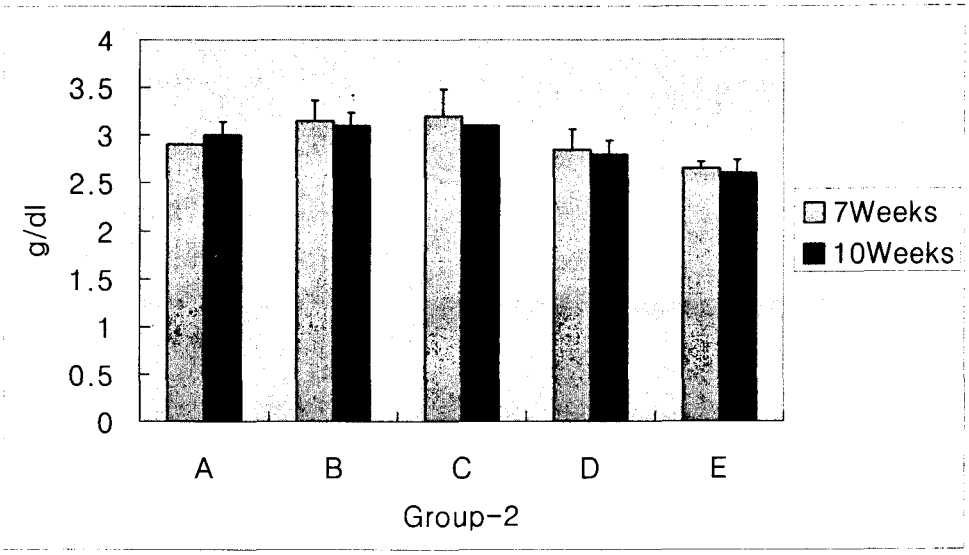


Fig. 3. Serum immunoglobulin G concentration. Mice immunized with SRBC as describes in materials and methods.

6. 백혈구 백분율 계산 및 비장 조직 검사

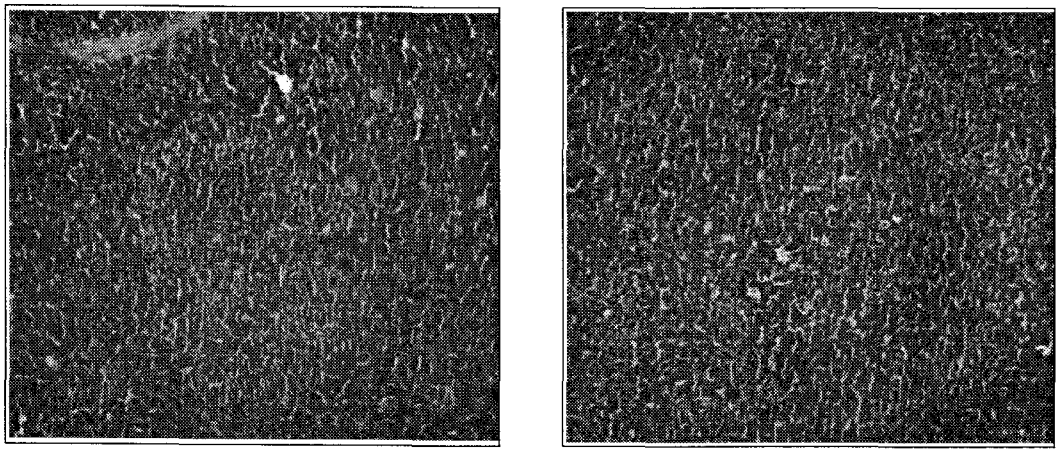
백혈구 백분율 계산에서는 급여군이 대조군에 비해 커다란 차이를 보이지 않았다. 생체내에서 면역반응에 주요한 역할을 하는 것으로 알려진 림프구는 B, C군이 대조군에 비해 증가하는 결과를 보였다(Table 2).

Table 2. Differential white cell counts of ICR mice after 4 weeks fed experimental diets(%)

Group	Weeks	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Basophils
A	7	14.17±4.54[1)]	82.00±6.10	1.83±1.17	0.33±0.82	0.67±0.52
	10	13.80±3.11	83.60±4.04	1.20±0.10	0.80±0.45	0.60±0.55
B	7	16.00±2.45	81.00±2.71	1.75±0.96	0.75±0.96	0.50±0.58
	10	11.50±2.43	86.17±3.06	1.50±0.84	0.33±0.52	0.50±0.55
C	7	13.60±3.05	83.80±3.03	1.80±0.45	0.40±0.55	0.40±0.55
	10	12.20±2.68	85.40±2.88	1.60±0.55	0.40±0.55	0.40±0.55
D	7	15.12±8.52	78.00±37.96	0.96±0.82	0.88±0.24	0.64±0.48
	10	19.25±2.63	77.75±2.63	1.50±0.29	0.75±0.96	0.75±0.96
E	7	19.50±1.76	77.67±1.51	0.83±0.75	1.17±0.75	0.83±0.41
	10	17.50±2.88	80.00±3.22	1.17±0.98	0.67±0.82	0.67±0.52

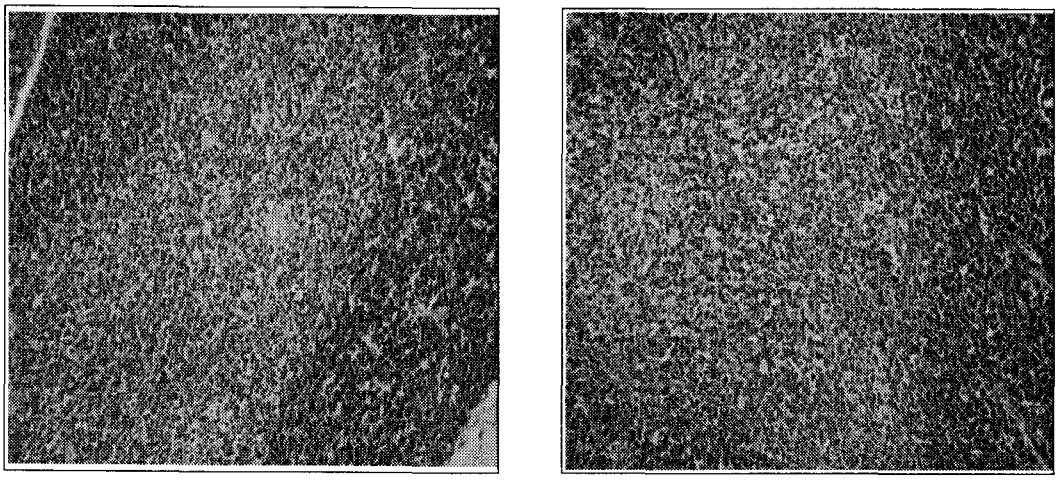
[1)] Values are mean±S.D.(n=6).

비장 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과 실험 기간 중 C군에서 white pulp 가 가장 심하게 증식되어 활발한 면역 반응을 예상할 수 있었고 B군에서도 약간의 white pulp 증식 소견이 관찰되었으며, B, C군에서는 종중심에서의 림프구의 유리가 관찰되었다(Fig. 4). 흉선 조직 검사에서는 B그룹에서 육안적으로 심하게 종대된 마우스의 경우 림프 소절의 심한 종대가 관찰되었고 B, C 그룹에서는 림프 소절의 종대와 소절의 증대 소견이 관찰되었다(Fig. 5). 한편, 폐조직과 신



A B

Fig. 4. Photograph and light microscopic findings in the male rats spleen from experimental diets and control groups. In the control rats was spleen appear normal (A). The treated rats showed lightly lymphocyte depletion and enlargement of germinal center in spleen(B). Hematoxylin & Eosin; Magnification: 200×.



A B

Fig. 5. Photograph and light microscopic findings in the male rats thymus from experimental diets and control groups. In the control rats was thymus appear normal (A). The treated rats showed enlargement and lymphocyte depletion (B). Hematoxylin & Eosin. Magnification: 200×.

장 조직에서는 실험식이 급여군과 대조군에서 모두 정상적인 소견을 보였다. 간 조직 검사에서는 A군에서 약간의 공포 변성이 관찰되었고 이는 D와 E 그룹의 대조군 마우스에서도 동일한 소견이 관찰되어 실험에 사용된 식이와는 관계가 없었던 것으로 생각된다.

요 약

가시오가피와 더덕 추출물을 첨가한 발효유가 마우스의 면역 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 선발된 수컷 마우스를 대상으로 하여 발효유에 가시오가피와 더덕 열수 추출 건조물(가시오가피 : 더덕 = 8 : 2)을 혼합하여 투여한 그룹 1mg/mL(A), 3mg/mL(B), 9mg/mL(C)의 3그룹으로 나누어 임상 적용 경로인 경구 투여를 선택하여 발효유를 각각 3 mL/kg씩 위내로 직접 투여하였다. 대조군은 발효유만 먹인 그룹(D)과 식염수만 먹인 그룹(E)을 두었다. 실험 결과 모든 그룹에서 마우스의 증체량과 체중 증가는 유의성이 없었고, 7주와 10주령에 안락사 시킨 마우스의 각 장기인 간, 신장, 심장, 폐, 고환의 무게에서도 유의성이 없었다. 비장 계수는 7주령에서는 B군에서 유의성 있는 차이를 보였고 10주령에는 C군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었다($p<0.05$). 비장 계수는 식이 지속 기간이 길어질수록 증가되었고, 흉선 계수는 B군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었다($p<0.05$). 항체 생산 세포수는 가시오가피와 더덕을 급여한 군 모두에서 대조군에 비해 증가하였으며, 특히 A, C군에서는 유의성($p<0.05$)이 있었다. 모든 그룹에서 항체 생산 세포수는 10주령에서 7주령에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 항원에 대한 항체 생성량을 알아보기 위하여 혈구 응집 반응을 실시한 결과 가시오가피와 더덕을 급여한 군에서 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였고 7주령 A, C 군에서는 유의성 있는 차이를 보였으나 10주령에서는 C군에서만 유의성 있는 차이가 나타났다($p<0.05$).

참고문헌

1. Chang, Y. K. *et al.* (1986) *Yakhak Hoeji.* 30(1): 1-7.
2. Chung, B. S. *et al.* (1976) Program the 25th annual convention of the Pharmaceutical Society of Korea. 26.
3. Gilbert, A. B. *et al.* (1983) *J. Nutr.* 113: 1187-1194.
4. Hirata, F. *et al.*(1996) *Atherosclerosis.* 122: 135-136.
5. Lee, Y. S. *et al.* (1993) 韓國飮食文化硏究論叢. 245.
6. Maeng, Y. S. *et al.* (1991) *Korean J. Food Sci. Technol.* 23(3): 311-316.
7. Ovodov, Y. S. *et al.* (1971) *Khim. Prirodnih. Soedin.* 1618-622.
8. Park, J. Y. *et al.* (1989) *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 32(4): 338-343.
9. Richar, W. *et al.* (1986) *J. Nutr.* 116: 641-654.
10. Yang, H. S. *et al.* (1975) *J. Pharm. Soc. Korea.* 19(3): 209-213.
11. 辛民敎. (1986) 原色臨床本草學. 南山堂, 서울, 230.