

▶ 특별강연-IV

국내산 농산소재료부터 항아토피 및 면역 증강 물질의 개발

이 상 한

경북대학교 식품공학과 교수

1. 서 론

아토피(atopy)는 대표적인 알레르기 질환으로 뚜렷한 발병경로가 밝혀지지 않은 질병 중의 하나이다. 알레르기(allergy)란 어떤 물질에 2차적으로 접촉 후 발생하는 신체조직의 병적인 과민 상태를 말하는데, 아토피, 천식, 비염 등이 이 질환에 분류된다.

알레르기(allergy) 질환은 외부의 항원에 대한 알레르기 면역반응이 발병에 중요한 역할을 하며 외부의 항원에 대한 IgE, eosinophil, 비만세포를 매개로 하는 즉각적인 면역반응과 CD4⁺ T 세포에 의해 매개되는 후기반응으로 나뉘며, 이 중 IgE를 통한 즉각적인 면역반응보다 CD4⁺ T helper 2 (Th2) 세포에서 분비되는 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)이 호산구성 만성염증을 일으키는 주요 병인이라는 사실이 알려지면서 최근 Th1 반응은 감소되고 Th2 반응이 증가되고 있다는 'Th2가설'이 주장되고 있다. CD4⁺ T세포가 생성하는 사이토카인의 종류에 따라 Th1과 Th2 세포로 분류가 된다. Th2 세포는 IFN-gamma 와 TNF-alpha를 생성하지 않고 IL-4, IL-5, IL-9, IL-13을 분비하여 IgE와 eosinophil, mast cell를 매개로 일어나는 알레르기 염증반응에 관여하는 반면, Th1 세포는 IL-2, IFN-gamma, TNF-alpha를 생성하여 세포내 감염체에 대해 일어나는 알레르기 반응을 억제한다.

본 총설에서는 최근에 아토피 환자가 급증하고 있는 시점에서 아토피의 완화를 목적으로 여러 가지 농산물로부터 이의 스크리닝을 수행한 결과를 중심으로 연구개발과정을 기술하는 한편,

hypersensitivity와는 반대적인 개념으로 면역 증강 활성의 소재개발에 대한 이해를 돕고자 한다.

2. 항아토피 소재 개발

(1) 재료의 추출

본 실험에 사용된 뽕은 감은 각 시기별로 채취가 되었으며 수확과 동시에 경북대학교 농업생명과학대학 식품공학과 식품효소생물공학실로 옮긴 후 감나무 잎은 즙을 내어 사용하고 열매, 꼭지는 잘게 분쇄한 후 DW, DMSO, 50% Ethanol, 50% Methanol, 50% Acetone에 추출하였으며, DW의 경우는 24시간 60°C의 오븐에서 추출하였고, 그 외의 용매는 24시간동안 shaking 과정을 거쳐 추출을 하였다.

(2) 항산화 활성 측정시험

본 실험에서 진행된 항산화 활성 측정시험은 기존에 알려져 있는 여러 가지 방법 중 대표적인 DPPH free radical scavenging assay를 선택하여 진행하였다.

(3) 아토피 유발 동물 모델 구축

아토피 유발 동물 모델 구축에 사용된 동물은 BALB/c 마우스, 6~8주령 된 수컷을 효창사이언스로부터 구입하여 사용하였고, 아토피 유발에 사용된 chemical은 DNFB(2,4-dinitro-1-fluorobenzene; Sigma Co.)가 사용되었다. BALB/c 마우스는 일주일 동안의 순화기간이 지난 후, 복부에 DNFB를 감작시켜 면역세포를 유도하였으며, 감작 후 4일 간격으로 총 3회 DNFB를 도포하여 아토피를 유발 한 후, 감작 7일째 되는 날부터 2일 간격으로 추출물 sample을 처리하여 마지막 sample 처리 24시간 뒤 마우스를 희생하였다.

(4) 아토피 유발 동물 모델에서의 사이토카인 측정

사이토카인(cytokine)은 면역 세포가 분비하는 단백질을 총칭하는 말로서, 분비 된 후 다른 세포나 자신에게 영향을 줄 수 있으며, 대식세포의 증식을 유도하거나 자기 자신의 분화를 촉진하기도 하며, 면역반응 및 염증반응의 매개체 역할을 하고, 림프구의 활성화와 성장 및 분화를 조

절하고 미성숙 백혈구의 성장 및 분화를 조절하는 기능을 가지고 있다. 많은 종류의 사이토카인(cytokine) 중 면역과 관련된 사이토카인은 대표적으로 IL-4와 IL-13을 들 수 있다. IL-4(Interleukin-4)는 Th2 세포의 분화를 촉진하며, B-림프구의 증식 및 분화인자와 비만세포의 증식인자, 그리고 대식세포의 활성화 인자로서 작용하며 IL-1(Interleukin-1)이나 TNF의 합성을 억제하고 분비되는 세포의 종류에는 Th2, Tc2, NK, NK-T, MC, $\gamma\delta$ T 등을 분비한다.

IL-13(Interleukin-13)은 활성화 된 Th2 cell에서 생산된 10kDa의 protein으로 B7 또는 활성화된 항원-제시 세포의 표현에 관련된 분자와 T cell 표면의 CD28의 ligation에 의해 유발되며, B cell 증식과 분화를 자극하여 IgG4와 IgE 분비를 증가시키고 IFN- γ 의 NK cell 생산을 조절하면서 IL-2와 공동으로 작용을 하게 된다. 또 다른 특징적인 것은 IL-13은 IL-4와 달리 T cell에 영향을 주지 않는 특징을 가지고 있다.

이 두 가지 사이토카인을 이번 실험에서 측정을 하였는데, 개시 감각 후 16일째 되는 날 마우스를 희생 후 혈액을 채취하여 centrifuge 5415R(ependof CO.)을 이용하여, 4°C, 3000rpm, 10분 원심분리 하였다. 분리된 혈청 10 μ l를 ELISA buffer와 함께 ELISA plate에 넣은 후 실온(37°C)에서 1시간 반응 시킨 후 Washing buffer를 이용하여 plate를 5번 세척 후 반응정지 용액을 첨가하여 실온(37°C)에서 1시간 동안 반응 시켰다. 1시간 반응 후 plate를 3번 정도 세척 한 후 HRP conjugated goat anti-mouse IL-4 또는 IL-13 항체를 넣어 실온(37°C)에서 반응 후 세척하여 준 후, 기질 반응 용액을 각 well에 넣은 다음, 실온(37°C)에서 30분간 반응 시켜 색깔 변화를 유도하여 ELISA reader(1420 Multilabel counter; PerkinElmer)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(5) 아토피 유발 동물 모델에서의 헤마톡실린-에오신 염색

모든 생물체를 구성하는 구조적, 기능적인 기본단위는 세포(cell)이며, 이들 세포는 매우 다양한 종류를 가지며 이들 세포 중에서 비슷한 기능과 형태를 한 세포의 집단을 조직(tissue)이라고 한다. 조직은 크게 상피조직(epithelial tissue), 결합조직(connective tissue), 근육조직(muscular tissue), 신경조직(nervous tissue)등 4가지로 이루어진다.

이번 아토피 유발 동물 모델에서 아토피를 검증을 위해서 상피조직에 대한 헤마톡실린(hematoxylin)-에오신(eosin) 염색을 시행하였다. 헤마톡실린(hematoxylin)은 천연염료이며 일종의 매염염료(mordant dye)로 작용하여 전처리에 따라 여러 가지 물질들을 염색 할 수 있고 염기성 염료에 잘 염색되는 염기호성 성분을 염색한다. 에오신(eosin)은 산성염료(acid dye)로 작용하여 산성염료에 잘 염색되는 산호성 성분을 염색한다고 알려져 있으며, 세포에서 비교적 산호성을

나타내는 성분은 적혈구(red blood cell, RBC, erythrocyte)의 헤모글로빈(hemoglobin)과 미토콘드리아(mitochondria), 근원섬유(myofibril) 정도이며 세포질의 구성단백질은 대부분 약한 산호성을 나타내는 성질을 이용하여 헤마톡실린-에오신 염색을 진행하여 상피조직을 확인하였다.

(6) 아토피 유발 동물 모델에서의 Immunohistochemistry 검증

일반적인 현미경적 구조를 관찰할 경우에는 헤마톡실린(hematoxylin)-에오신(eosin) 염색등의 일반적인 조직학적 염색 방법을 사용하지만 세포나 조직 내에 있는 특정한 성분을 확인하기 위해서는 다른 종류의 염색이 필요하다. 이를 위해 여러 가지 특수염색이나 조직화학(histochemistry)등 여러 가지 방법이 동원된다. 이러한 방법들 중에서 항원-항체 반응(antigen antibody reaction)을 이용하여 특정한 물질이나 구조 등을 선택적으로 확인할 수 있는 면역조직화학적 염색 방법이 가장 강력한 방법으로 널리 사용되고 있다. 면역조직화학 염색은 조직 내의 항원을 이에 대한 항체로 처리하여 생성된 항원-항체복합체에 표지물질을 붙여 이를 현미경을 통해 관찰하는 방법이다. MMP-2와 MMP-9은 기질단백분해효소로서 기저막의 주요 성분인 젤라틴(gelatin)과 교원질을 분해하며 염증 반응시 염증세포들의 이동과 침윤을 촉진시켜주는 작용을 하므로 이 2가지의 antibody가 아토피의 염증세포들과 관련이 있다고 생각하여 이를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 면역조직화학 염색의 과정은 각 실험 군에서 나온 각 조직을 4 μ m 두께의 조직 절편 슬라이드에서 xylen을 이용하여 파라핀을 분해시키고 고농도(100%)에서 저농도(70%) 에탄올(ethanol) 내에서 재수화(rehydration) 시킨 후 메탄올(methanol)과 30% 과산화수소(H₂O₂) 혼합액에서 30분 노출시켜 endogenous peroxidase를 차단시켰다. 비특이적 반응의 차단을 위해서 1.5% NHS(normal horse serum)으로 30분간 반응시켰다. MMP-2, MMP-9(Santa Cruz Bio., San Francisco)에 대한 일차항체를 1:500 v/v의 농도로 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시켰다. 세척 후 비오틴이 결합된 2차항체를 30분 반응시킨 후, Substrate chromogen solution 으로 발색하고, 대조염색은 hematoxylin으로 시행하였으며, 형광현미경(Microscope System; Axioplan 2 etc)을 이용하여 관찰하였다.

(7) 결과

감의 열매 DW 추출물 처리군에 대한 H&E 염색 후 현미경으로 관찰한 결과, DNFB의 경우 아토피의 유발로 인하여 평균 25,000~35,000개의 염증 세포들을 확인 할 수 있었으며, D·IEG

의 경우 DNFB 처리군에 비교하여 염증 세포의 수는 많이 저하 되었으나, 일시적인 아토피 억제효과는 있으나 장기적으로 사용시 부작용이 우려된다. 한편 감 열매 DW 추출물은 아토피 억제 효과가 매우 우수함을 그림에서 보듯이 알 수 있는데, D·IEG와 비슷한 수준을 유지한 것으로 보아 아토피 억제효과가 좋은 것으로 판단되어 진다(그림 1). 그림 1에서의 항아토피 활성을 MMP-2의 활성 억제로 다시 확인하였는바, 그림 2에서 보는 바와 같이 샘플처리군1에서 우수한 활성이 확인되었다. 따라서 향후 이의 활성 fraction 또는 물질의 부분정제를 수행하고 이 물질에 의한 항아토피 활성기전을 연구함으로써 농산물의 고부가가치화를 이룩하는 지름길이라 판단된다.

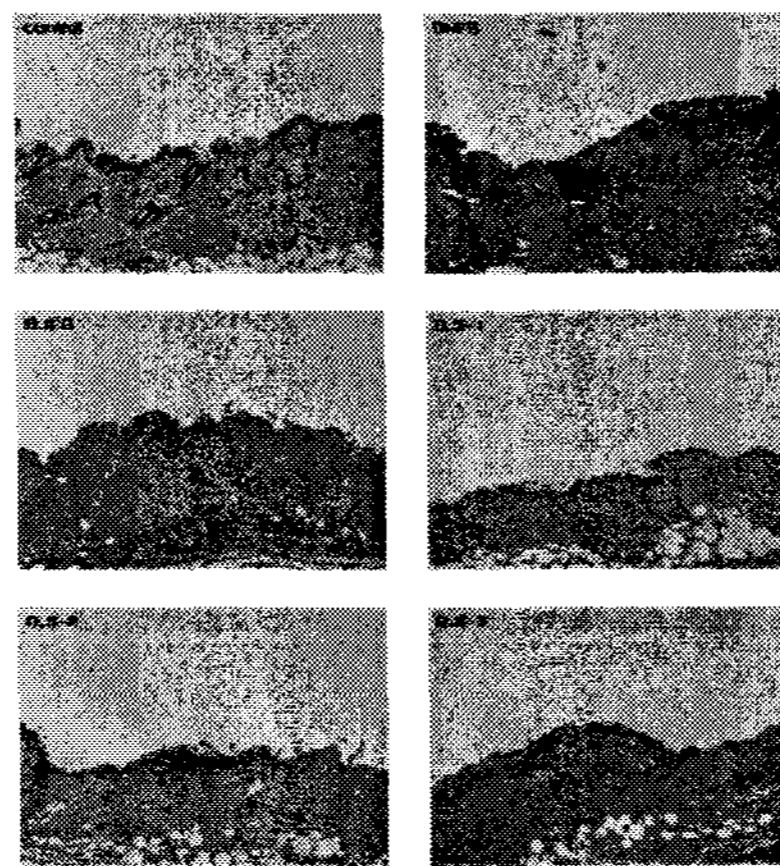


그림1. 농산물 소재에 의한 항아토피 완화 활성의 비교 (HE staining)

control: DW 처리, DNFB: 아토피 유발군, D.IEG: positive control, D.S-1: 샘플처리군1, D.S-2: 샘플처리군2, D.S-3: 샘플처리군3.

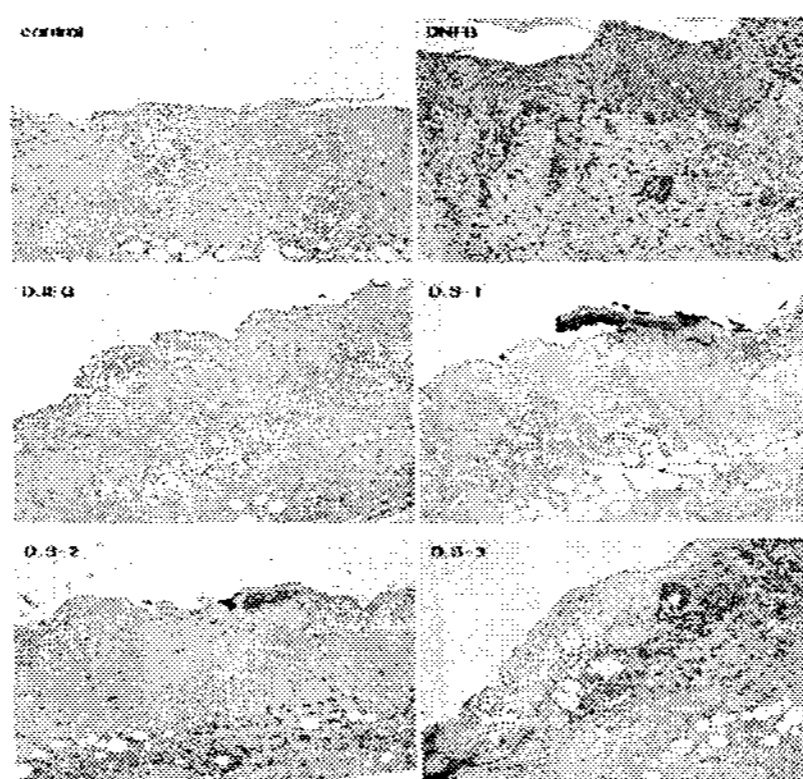


그림2. 농산물 소재에 의한 항아토피 완화 활성의 비교 (MMP-2 발현)

control: DW 처리, DNFB: 아토피 유발군, D.IEG: positive control, D.S-1: 샘플처리군1, D.S-2: 샘플처리군2, D.S-3: 샘플처리군3.

3. 면역 증강 소재의 개발

면역증강은 어떤 의미에서는 hypersensitivity(과민반응)와는 반대적인 개념이라고 할 수 있다. Hypersensitivity의 경우에는 면역 활성을 적절하게 억제시킬 필요가 있다면, 면역 증강은 면역 활성이 어느 level에서 외부 환경 반응에 대응하여 일정한 level 이상으로 상승시켜야 할 필요성이 존재하는 경우에 해당된다고 볼 수 있다. 따라서 면역 증강의 활성을 검증하는 분자 표적으로 항암활성을 나타내는 분자표적에 관심을 두었다. 따라서 국내 농산물의 소재로서는 경북북부지방에서 생산되는 여러 가지의 콩(두류), 특히 isoflavone 계통의 물질군과 polyphenol 물질, 그리고 이들의 elicitation으로 생산될 수 있는 여러 가지의 항암 또는 면역활성증강 물질에 기반을 두고자 한다. 즉, CD44, uPAR, MMP-2, MMP-9, ICAM, VCAM, TIMP, ARF3의 활성 변화를 동물실험을 통하여 암 세포(B16 melanoma 사용)가 전이된 각 조직 또는 혈액으로부터 RT-PCR, western blotting, immunohistochemistry를 통하여 추적하고자 한다.

(1) Invasion assay

상처치유는 암세포의 운동성을 확인하는 방법으로 부착세포인 B16F10 세포를 플레이트에 잘라내고 이산화탄소 배양기에서 2시간 배양한다. 이후 피펫맨 팁을 이용하여 약 1 밀리미터의 상처를 만든 다음, 배양액을 교환하였다. 시료를 적절한 농도로 처리한 다음 37도의 5% 이산화탄소 배양기에서 36시간 배양 후 치유정도를 현미경을 통하여 관찰하였다.

(2) Invasion assay

Matrigel(354234, Beckton Dickinson, San Jose)을 chamber(3401, Costar, NY)에 바르고 난 후 gel이 굳으면 chamber의 아랫부분에 fibronectin을 도포하였다. RPMI 1640 (-FBS)을 넣은 후 37도에서 2시간 배양 후 B16F10을 약 500,000마리/well의 수로 넣은 다음 5% 이산화탄소의 환경에서 37도에서 2 시간 배양 후 시료를 처리한 다음 동일 조건에서 24 시간 배양하였다. 메탄올을 이용하여 고정한 다음, hematoxilin을 이용하여 세포를 염색하였다. 이후 현미경을 이용하여 침윤 정도를 세포의 수를 세어 확인하였다.

(3) B16 흑색종 모델

B16F10 암세포를 사용하여 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥에 약 500,000마리 정도 주사하면 이 세포들이 특이적으로 14일 내에 폐에 전이하게 되는데, 이를 이용하여 폐를 포르말린으로 고정

하고 전이된 덩어리의 수를 세어서 대조구와 샘플 처리구와의 차이를 비교한다.

그림 3(中)은 대조구(A), 아드리아마이신(B), 베타-글루칸(C), 베타-글루칸과 아드리아마이신 동시 처리(D)에 의한 활성 비교를 나타낸 그림인데, 대조구에서는 폐에 전이된 작은 덩어리가 조건에 따라서 약100-200 여개 정도인데 반하여, 아드리아마이신 또는 베타-글루칸을 투여한 군에서는 급격한 감소를 보였다. 심지어 베타-글루칸과 아드리아마이신 동시 처리에 의하여 90% 이상의 암세포 전이 활성이 억제되었다. 따라서 콩의 어떤 성분이 암세포 전이 억제에 효과를 나타내는지에 대한 연구가 진행되고 있다.

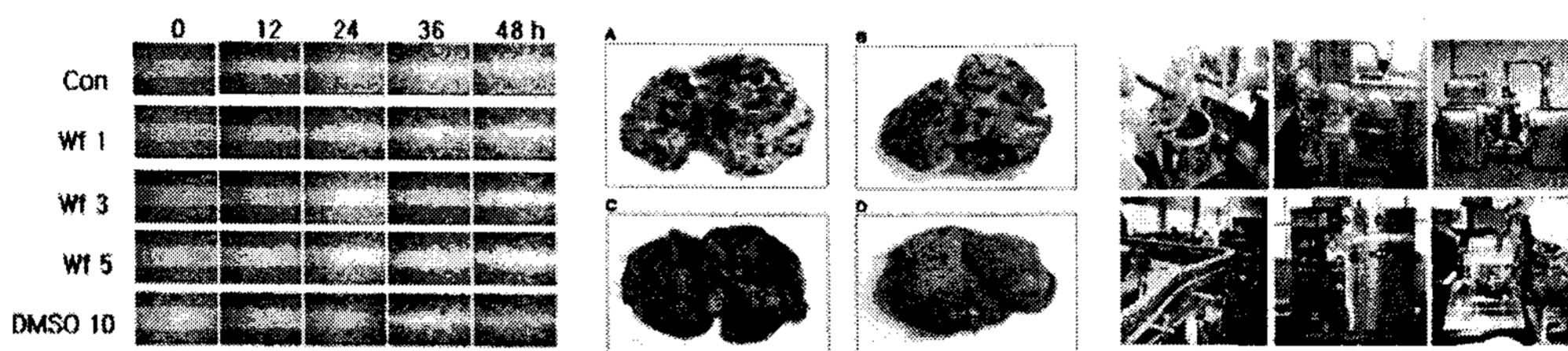


그림 3. Wound assay(左), in vivo B-16 model(中), 음료시제품 제조라인(右).

(4) Tube formation assay

체대정맥내피세포(human umbilical vein endothelial cells)를 배양하여 약 20,000마리 정도를 각 농도별로 시료가 함유된 EGM-2 배지에 넣고 매트릭셀을 도포한 24웰 플레이트에 놓아두고 24 시간 후에 현미경으로 형태를 관찰한다. 그림 10과 같이 0 (a), 25(b), 50(c), 100(d)의 다이켈릭산 처리에 의한 항암 활성을 비교하여 보았다. 그 결과 50 마이크로몰 이상의 농도에서는 세포 상호간 튜브의 형성이 강력하게 억제(Heo 등)되고 있어서 항암활성이 우수하다고 판정할 수 있다. 이 방법도 기존의 여러 가지 포도의 활성성분과 동시 투여로 암세포 전이 억제에 어떤 효과를 나타낼지에 대한 연구가 필요하다고 보며, 여러 가지의 생체 내 시험(in vivo assay)을 거쳐서 확인한다면 좋은 결과가 도출되리라 판단된다.

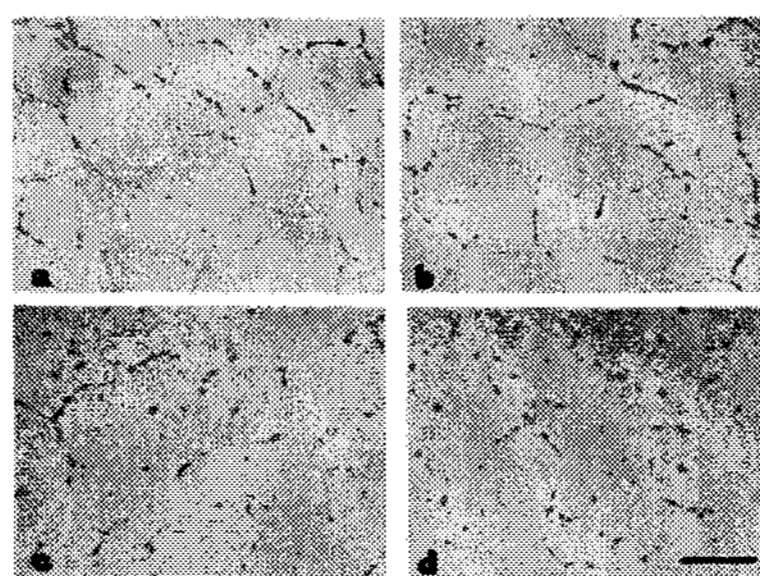


그림 4. Tube formation assay에 의한 항암활성 검증.