

면역기능 증강 신물질에 대한 마우스의 면역학적 및 혈액학적 변화

정 지 윤*

서울대학교 수의과대학
(게재승인: 2005년 11월 28일)

Changes of immunostimulatory effects by Immu-Forte on mice

Ji-Youn Jung*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Accepted: November 28, 2005)

Abstract : Immu-Forte composed of chitosan, β -glucan, manno-oligosaccharide and pangamic acid was evaluated for its effectiveness as a nonspecific immunostimulator in mice. The effects of Immu-Forte were determined by analysis of cytokines using ELISA and phenotype of leukocyte subpopulations using monoclonal antibodies specific to mouse leukocyte differentiation antigens and flow cytometry. All T cells, all B cells, CD4 T cells, CD8 T cells, macrophages, IL-2, IL-4, IL-12 and IFN-r in Immu-Forte A-treated group increased in 1 months posttreatment and were significantly higher ($p < 0.05$) than that of control at 1 months posttreatment. All T cells, all B cells, CD4 T cells, CD8 T cells, macrophages and IL-2 in Immu-Forte EX-treated low and middle dose groups increased in 1 months posttreatment and were significantly higher ($p < 0.05$) than that of control at 1 months posttreatment. In the Immu-Forte soybean-treated group, NK cells and IL-4 were significantly higher in middle dose-treated group, and IL-2, IL-4 and IFN-r were significantly higher in low dose-treated group. In the Immu-Forte F-treated group, all T cells, all B cells, CD4 T cells, CD8 T cells, macrophages, NK cells, IL-2, IL-4, IL-12 and IFN-r in high dose-treated group and all T cells, all B cells, CD4 T cells, CD8 T cells, macrophages, IL-2, IL-4, IL-12 and IFN-r in middle dose-treated group and NK cells, IL-2, IL-4, IL-12 and IFN-r in low dose-treated group were significantly higher ($p < 0.05$) than that of control at 1 months posttreatment. In conclusion, this study has demonstrated that Immu-Forte had an immunostimulatory effect on mice through proliferation and activation of mouse immune cells.

Key words : cytokines, Immu-Forte, leukocyte, nonspecific immunostimulator

서 론

최근 축산업이 집단사육형태로 발전 되어 감에 따라 효율성이 증대된 반면 질병에 대한 노출 및 질병전파의 위험성은 더욱 높아지게 되었으며 이러한 질병을 예방, 치료하기 위한 약제의 사용이 증가하고 있다 [1]. 이러한 질병감염의 위험성을 제거하기 위하여 백신의 개발 및 백신 치료제에 대한 프로그램의 개발, 항균제의 사료

첨가에 의한 사전 감염 차단 등의 다양한 방법이 이용되고 있다 [7]. 그러나 이러한 질병 예방과 치료를 위한 방법 중에서 백신의 이용은 포괄적인 질병 방어보다는 제한적인 특정 질병 원인체에 대해서만 효과를 거둘 수 있을뿐만아니라 병원성이 높은 미생물의 감염시에는 그나마도 기대에 미치지 못하는 결과를 가져오게 된다 [3]. 또한, 최근에는 사료첨가용이나 치료약제로 이용되고 있는 항균제의 무절제한 사용과 휴약기간의 미준수로 인

*Corresponding author: Ji-Youn Jung
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: +82-2-880-1298, Fax: +82-2-876-7610, E-mail: wangza@snu.ac.kr]

한 항균제 다제 내성균의 출현을 초래하게 되었고 이에 따른 항균제의 축산물내 잔류로 인한 인체에의 영향이 크게 우려되고 있는 실정이다 [1, 3].

따라서, 이러한 질병에 대한 예방제 및 치료제로서의 대체 물질 개발에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 이루어지고 있으며, 이러한 연구 분야중에 동물생체에 잔류하지 않고 인체에 영향을 주지 않는 생체면역 증강제에 대한 연구가 활발히 이루어 지고 있다 [2, 6].

본 연구는 면역기능을 증강시키는 생물체제인 Immu-Forte의 면역체계 활성화에 따른 생체 내에서의 변화를 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시험 동물

면역기능 증강성 물질 투여에 의한 마우스에서의 면역학적 세포 및 사이토카인의 변화 및 혈액학적 변화를 알아보기 위하여 5주령의 암컷 Balb/c 마우스 70마리를 오리엔트(주)에서 구입하였다. 본 시험에 사용될 마우스는 면역기능 시험에 있어서 지금까지 많이 사용되어 왔기 때문에 비교할 많은 기초 자료가 있어서 선택하였다.

실험실에 순화시키는 기간을 약 1주일간 두었으며, 그 기간 중에 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다. 본 시험은 온도 22±3°C, 상대습도 50±10%, 환기 회수 10-12회/hr, 조명시간 12시간(07:00-19:00), 조도 150-300Lux로 설정된 서울대학교 수의과대학 동물사육장 동물실험실 5호실에서 실시하였다.

시험 면역증강제

본 실험에 제공된 시험물질은 Immu-Forte EX, Immu-Forte 된장 고추장, Immu-Forte A 및 Immu-Forte F로서 Immu-Forte EX는 전통 누룩유래의 삭카로마이세스(*Saccharomyces*) 베타-1, 3- 및 베타-1, 6-글루칸, 비타민 B, 비타민 C, 글루타치온, 판가민산으로 구성된 물질이며, Immu-Forte 된장고추장은 키토산, 베타-글루칸, 키토올리고당, 이소플라본(Isoflavon)으로 구성되었고, Immu-Forte A는 전통 메주유래의 라이조프스 키토산(*Rhizopus chitosna*), 삭카로마이세스(*Saccharomyces*) 베타-1, 3- 및 베타-1, 6-글루칸, 라이조프스 키토올리고당(*Rhizopus chitooligosaccharides*)으로 구성되었으며, Immu-Forte F는 삭카로마이세스(*Saccharomyces*) 베타-1, 3- 및 베타-1, 6-글루칸, 만노올리고당(manno oligosaccharide), 비타민 B, 비타민 C, 글루타치온, 판가민산으로 구성되었다. 각각의 물질은 사람에게 적용하는 용량을 중간그룹의 용량으로 설정하고 그 용량의 2배수를 고용량으로, 절반을 저용량으로 두고 실험을 실시하였다. EX

는 성인 65 kg을 기준으로 하였을때 1일 섭취용량이 75 ml 이었으며, Immu-Forte 된장고추장은 5 g, Immu-Forte A는 0.5g 사료 첨가제로 개발되어진 Immu-Forte F는 톤당 2 kg을 1일 섭취량으로 기준을 삼았다.

마우스 비장에서 면역세포 분석검사

시험물질들을 1개월간 매일 투여한 후 마우스에서 비장을 적출하여 면역세포의 증가 유무 및 사이토카인의 변화를 Flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 분석한 세포 및 사이토카인은 T cell, B cell, CD4 T cell, CD8 T cell, IL-2, IL-4, IL-12, IFN-r, IgG, IgM, macrophage, NK cell이다. 이러한 세포 및 사이토카인의 변화를 측정하기 위하여 세포는 1개 또는 2개의 형광색소(FITC 및 phycoerythrin)를 이용하여 표식이 되어 있도록 실험을 설계하였으며, 염색이 완료된 재료는 flow cytometry를 이용하여 총 2000개 이상의 세포들을 검사하여 세포수를 측정하였으며 측정과 자료분석은 FACSCalibur 및 CellQuest program을 이용하여 실시하였다. 또한, IL-2, IL-4, IL-12, IFN-r의 정량적인 수치를 얻기 위하여 sandwich-ELISA를 이용하여 혈중 사이토카인을 측정하였다.

혈액학적 변화 분석

시험물질에 의한 생체내에서의 혈액학적 변화를 측정하기 위하여 1개월 투여후 마우스의 안와에서 혈액을 채취하였으며, 혈청을 분리 후 혈액학적 분석을 실시하였다.

통계학적인 처리

대조군을 비롯한 Immu-Forte EX, Immu-Forte 된장고추장, Immu-Forte A 및 Immu-Forte F간의 평균치 유의성을 검정하기 위하여 분석치에 대하여 Microcal Origin 6.0(Microcal Software, USA)을 사용하여 ANOVA test를 실시하였으며, 동일시험 기간에서의 대조군과 시험물질 처리군들의 비교를 위하여 Student's t-test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

결 과

면역증강

생체 내에서의 자기 방어기전은 대식세포등의 항원전달세포와 T림파구를 중심으로 하는 일련의 면역반응에 의해 이루어진다 [4, 5]. 이러한 체내 면역 증강성을 관찰하기 위하여 체내 임파구의 활성화 및 증가 여부를 1개월간 의뢰한 물질인 Immu-Forte EX, Immu-Forte 된장고추장, Immu-Forte A, Immu-Forte F를 투여한 후, flow-cytometry를 이용하여 측정하였다.

Table 1. The changes of immun-cells in the spleen of mice at 1 months posttreatment of Immu-Forte

Dose	Immu-Forte EX				Immu-Forte soybean paste			Immu-Forte A			Immu-Forte F		
	Control	High	Middle	Low	High	Middle	Low	High	Middle	Low	High	Middle	Low
Total T cell	4.9± 2.9	2.8± 0.8	29.1± 0.8	12.9± 2.2	-	-	-	30.7± 6.7	16.1± 12.1	11.9± 4.5	9.2± 4.3	10.3± 4.7	2.8± 4.2
Total B cell	10.0± 5.1	4.7± 0.7	38.4± 9.4	24.7± 2.5	-	-	-	46.6± 4.9	34.7± 8.5	27.3± 3.5	27.6± 5.0	32.1± 6.1	1.0± 1.2
CD4 T cell	4.0± 3.2	8.5± 7.7	10.7± 7.4	8.3± 4.4	-	-	-	22.7± 3.8	21.0± 2.2	19.6± 3.1	10.6± 1.0	13.0± 1.8	0.6± 0.4
CD8 T cell	1.9± 0.7	2.5± 1.5	3.1± 2.2	2.2± 0.9	-	-	-	6.8± 1.2	6.7± 0.9	7.1± 1.4	3.5± 0.4	4.1± 0.3	0.6± 0.5
Macrophage	0.035± 0.005	0.046± 0.025	0.053± 0.041	0.057± 0.029	0.015± 0.007	0.07± 0.06	0.035± 0.007	0.127± 0.120	0.1± 0.071	0.066± 0.024	0.055± 0.040	0.064± 0.032	0.05± 0.043
NK cell	27.0± 6.6	10.2± 12.8	17.4± 15.7	14.0± 3.5	72.6± 40.9	68.6± 39.0	-	6.8± 2.5	12.5± 14.0	15.0± 7.6	33.8± 21.6	27.5± 22.9	72.0± 23.8

- : P < 0.05, No significantly difference from the control

Table 2. The changes of cytokines in the spleen of mice at 1 months posttreatment of Immu-Forte

ng/ml	Immu-Forte EX				Immu-Forte soybean paste			Immu-Forte A			Immu-Forte F		
	Control	High	Middle	Low	High	Middle	Low	High	Middle	Low	High	Middle	Low
IL-2	0.301± 0.051	0.097± 0.156	0.042± 0.048	0.195± 0.386	0.146± 0.107	0.172± 0.233	0.806± 2.260	0.688± 0.633	0.456± 0.428	1.578± 1.513	1.622± 2.750	4.578± 17.188	0.732± 2.310
IL-4	0.151± 0.0351	0.195± 0.101	0.155± 0.040	0.415± 0.184	0.148± 0.078	0.652± 0.723	0.580± 0.265	0.776± 0.228	0.766± 0.458	1.786± 0.565	8.596± 10.990	4.996± 6.637	0.688± 0.496
IL-12	0.217± 0.106	0.090± 0.104	0.154± 0.352	0.252± 0.025	0.136± 0.128	0.064± 0.134	0.132± 0.328	0.486± 0.322	0.140± 0.163	1.794± 1.635	2.716± 7.361	2.236± 6.111	0.427± 0.420
IFN- γ	0.224± 0.053	0.427± 0.066	0.087± 0.011	0.230± 0.357	0.012± 0.005	0.234± 0.894	0.86± 0.248	0.228± 0.017	0.796± 0.118	1.818± 0.186	2.438± 0.935	7.452± 3.098	1.214± 0.448

전체 T림파구의 수에 있어서는 Immu-Forte EX에서 대조군과 비교할 때 중간용량과 저용량에서 각각 5.8배, 2.6배의 증가를 보였으며, Immu-Forte A물질에서는 농도 의존적으로 고용량(6.2배), 중간용량(3.2배), 저용량(2.4배)의 증가를 보였고, Immu-Forte F에서는 고용량과 중간용량에서 각각 1.8배, 2.0배의 증가를 나타내었다. 이러한 결과를 미루어볼때 생체내에서 면역능력에 중요한 역할을 하는 T 림파구가 Immu-Forte 된장고추장을 제외한 Immu-Forte EX, Immu-Forte A, Immu-Forte F에서 증가하는 것을 알 수 있었고, 특히 Immu-Forte A 물질에서 가장 효과적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서, 세포성면역에 있어서 핵심적인 역할을 하는 T 림파구의 숫적 증가에 Immu-Forte A, Immu-Forte EX,

Immu-Forte F가 유의적으로 효과를 나타내는 것으로 추측된다.

체액성 면역에 있어서 핵심적인 역할을 수행하는 전체 B림파구에 있어서는 Immu-Forte A에서는 농도 의존적으로 유의적인 증가를 나타내었고, 그 수치에 있어서는 다른 시험 물질과 비교하였을때 가장 높은 수치를 나타내었다. 따라서, 체액성면역에 있어서는 Immu-Forte A, Immu-Forte EX, Immu-Forte F순으로 유의적인 면역 증강성을 나타내는 것을 알 수 있었고, T 림파구에서 분류되는 CD4 T 림파구 및 CD8 T 림파구에서도 숫적으로 Immu-Forte A, Immu-Forte EX, Immu-Forte F순으로 유의적인 면역 증강성을 나타내고 있다. 대식세포의 숫적 증가에 있어서는 유의적인 증가를 보이는 물질은

Table 3. The changes of blood-chemistry in 1 months posttreatment of Immu-Forte

	Alkaline phosphatase (U/l)	Total Protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Creatinine (mg/dl)	Alanine transferase (U/l)	Aspartate transferase (U/l)	Total Bilirubin (mg/dl)	K ⁺ (mmol/l)	Total Cholesterol (mg/dl)
Control	143.6±9.2	5.6±0.2	2.9±0.1	0.3±0.1	131.6±43.0	160.2±16.7	0.8±0.2	5.8±0.7	153.2±15.3
Immu-Forte EX (High)	168.3±16.6	5.6±0.6	2.8±0.3	0.5±0.3	114.3±43.8	196.5±19.5	0.9±0.4	5.9±0.2	133.0±11.6
Immu-Forte EX (Middle)	143.5±41.1	5.2±0.6	2.5±0.2	0.6±0.2	158.3±32.5	200.0±30.4	1.0±0.6	5.5±0.4	140.5±16.7
Immu-Forte EX (Low)	147.7±24.7	5.3±0.3	2.7±0.1	0.7±0.1	129.7±59.1	169.0±18.3	1.0±0.2	5.8±0.5	132.0±9.6
Immu-Forte soybean paste (High)	129.6±17.4	5.8±0.1	2.8±0.1	0.3±0.1	125.8±44.0	120.6±27.9	0.6±0.2	5.4±0.5	142.6±6.4
Immu-Forte soybean paste (Middle)	155.0±11.7	5.5±0.3	2.9±0.0	0.4±0.2	127.6±38.9	156.8±20.8	0.4±0.1	6.1±1.1	133.2±10.6
Immu-Forte soybean paste (Low)	145.2±20.4	5.6±0.2	3.0±0.2	0.3±0.1	105.8±58.5	181.8±16.9	0.7±0.5	6.3±1.2	144.4±2.4
Immu-Forte A (High)	134.0±11.1	5.6±0.2	2.9±0.2	0.4±0.1	122.8±56.9	136.4±58.7	0.8±0.4	5.8±1.1	140.0±7.1
Immu-Forte A (Middle)	152.4±8.6	5.7±0.4	2.9±0.3	0.8±0.7	116.4±89.0	171.0±73.5	0.9±0.5	5.6±1.5	144.2±5.5
Immu-Forte A (Low)	153.0±7.5	5.7±0.1	2.9±0.0	0.3±0.2	87.0±41.1	122.0±41.5	0.9±0.3	5.0±0.9	149.4±10.2

Immu-Forte EX, Immu-Forte A, Immu-Forte F였으며, 자연살해세포에서는 Immu-Forte 된장고추장의 중간그룹과 고용량그룹에서 유의적인 숫적 증가를 나타냈다. 이러한 점을 미루어보아 시험물질 4가지 모두 기본적으로 생체내의 면역능을 향상시키는 것으로 판단되어진다.

이러한 판단을 확인하기 위하여 sandwich-ELISA를 이용한 사이토카인의 변화를 측정해본결과(Table2), 자연살해세포의 growth factor 이면서 면역세포들의 활성을 촉진하는 IL-2의 경우 Immu-Forte A와 Immu-Forte F에서 유의적인 증가를 보였으며, IgE의 생산 및 Th2세포의 성숙에 있어서 중요한 역할을 하는 IL-4에서는 전군에서 유의적인 변화가 관찰되었고, 세포매개 면역에 있어서 초기반응에서 중요한 작용을 하는 IL-12는 Immu-Forte 된장고추장과 Immu-Forte F에서 대조군과 비교하여 유의적인 증가를 나타내었다.

이러한 결과를 종합한 결과, Table 1과 Table 2의 전체적인 수치를 검토해 보았을 때 면역증강성은 Immu-Forte A에서 가장 강력하게 증가하는 것을 판단되어지며, Immu-Forte EX, Immu-Forte F, Immu-Forte 된장고추장 순으로

체내에서의 면역증강성을 높여주는 것으로 여겨진다.

혈액학적 분석

Table 3의 혈액학적인 검사에서 alkaline phosphatase, T protein, albumin, creatine, ALT, AST, total bilirubin, potassium을 검사해 본 결과 대조군과 비교했을 때 투여군 전군에서 정상적인 범위 내 수치를 나타내는 것으로 나타났다. 이러한 정상적인 수치로서의 결과는 앞에서 면역학적인 세포의 숫적 변화 및 사이토카인의 변화가 질병이나 감염에 의한 변화가 아닌 정상적인 실험동물에서 나타난 결과라는 것을 나타내는 것으로서 이러한 혈액학적 변화의 결과가 정상적이라는 것이 필수 불가결한 요소라고 할 수 있다. 결론적으로 면역세포 및 사이토카인의 변화가 물질의 면역증강효과에 의한 것으로 판단되어진다.

콜레스테롤

1개월간 Immu-Forte EX를 투여 후 혈중콜레스테롤 수치를 검사해 본 결과 Table 3에서 대조군(153±15.29 mg/

dl)과 비교하였을 때, 고용량(133 ± 11.57 mg/dl), 중간용량(140.5 ± 16.66 mg/dl), 저용량(132 ± 9.64 mg/dl)으로서 혈중 콜레스테롤의 감소가 보였으나 통계학적인 유의적 감소로는 보이지 않는다. 이러한 결과로부터 의뢰한 Immu-Forte EX의 혈중 콜레스테롤 저하 효과는 없는 것으로 사료된다.

고 찰

체내 면역 증강성을 관찰하기 위하여 체내 임파구의 활성화 및 증가 여부를 1개월간 Immu-Forte EX, Immu-Forte 된장고추장, Immu-Forte A, Immu-Forte F를 투여한 후, flowcytometry 및 sandwich ELISA를 이용하여 측정하였다.

전체적인 수치를 검토해 보았을 때 분석결과 전체적인 면역증강성은 Immu-Forte A에서 가장 강력하게 증가하는 것을 나타냈으며, Immu-Forte EX, Immu-Forte F, Immu-Forte 된장고추장 순으로 체내에서의 면역증강성을 높여주는 것으로 나타났다.

혈액학적인 검사에서 alkaline phosphatase, T protein, albumin, creatine, ALT, AST, total bilirubin, potassium 을 검사해 본 결과 대조군과 비교했을 때 투여군 전군에서 정상적인 범위내 수치를 나타내는 것으로 나타났다.

1개월간 Immu-Forte EX를 투여 후 혈중콜레스테롤 수치를 검사해 본 결과 대조군(153 ± 15.29 mg/dl)과 비교하였을 때, 고용량(133 ± 11.57 mg/dl), 중간용량(140.5 ± 16.66 mg/dl), 저용량(132 ± 9.64 mg/dl)으로서 혈중콜레스테롤의 감소가 보였으나 통계학적인 유의적 감소로는 보이지 않는다.

결 론

Immu-Forte A, Immu-Forte EX, Immu-Forte F, Immu-Forte 된장고추장 순으로 체내에서의 면역증강성을 높여주는 것으로 나타났는데, 이러한 체내 면역 세포와 사이토카인의 변화가 혈액학적인 검사에서 정상범위 즉, 질병이나 감염이 없는 동물 생체 내에서 일어난 변화이므로

면역 세포와 사이토카인의 변화가 면역 증강에 의한 변화라고 판단할 수 있었다.

또한, 혈중콜레스테롤 수치는 Immu-Forte EX와 대조군과 비교하여 유의적인 변화가 없는 것으로 미루어 Immu-Forte EX는 혈중콜레스테롤 수치를 저하시키는 효과는 없는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 중소기업기술혁신개발사업 및 2005년도 한국학술진흥재단으로부터 연구비를 지원받았습니다(KRF-005-E00076).

참고문헌

1. **Anadon A, Martinez-Larranaga MR.** Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products; regulatory aspects. *Livest Prod Sci* 1999, **59**, 183-198.
2. **Berg RD.** Probiotics, prebiotics or conbiotics, *Trends Microbiol* 1998, **6**, 89-92.
3. **Bonneau M, Laarveld B.** Biotechnology in animal nutrition, physiology and health. *Livest Prod Sci* 1999, **59**, 223-241.
4. **Dutton RW, Bradley LM, Swain SL.** T cell memory. *Annu Rev Immunol* 1998, **16**, 201-223.
5. **Gonser S, Weber E, Folkers G.** Peptides and polypeptides as modulators of the immune response : thymopentin-an example with unknown mode of action. *Pharm Acta Helv* 1999, **73**, 265-273.
6. **Hart T, Lamont A, Williams D.** New drug targets in inflammation and immunomodulation. *Drug Discov Today* 1998, **3**, 516-521.
7. **Pedersen KB, Aarestrup FM, Jensen NE, Bager F, Jensen LB, Jorsal SE, Nielsen TK, Hansen HC, Meyling A, Wegener HC.** The need for a veterinary antibiotic policy. *Vet Rec* 1999, **145**, 50-53.