

## 합초 추출물의 마우스 면역 증강 활성

류덕선<sup>1</sup> · 김선희<sup>2</sup> · 이동석<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, BK21 식의약생명공학사업단

<sup>2</sup>인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터

**Immunomodulating Activity of *Salicornia herbacea* Extract.** Ryu, Deok-Seon<sup>1</sup>, Seon-Hee Kim<sup>2</sup>, and Dong-Seok Lee<sup>1,2\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science and BK21 Smart Food & Drug Center, <sup>2</sup>Department of Biomedical Laboratory Science and Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea – Immunomodulating effect of *Salicornia herbacea* extract on the mouse splenocytes was investigated. Crude *S. herbacea* polysaccharide extract (CSP) and other kinds of fine *S. herbacea* polysaccharides (SPI and SPII) were prepared from *S. herbacea* by hot water extraction and further ultrafiltration and gel filtration chromatography. In vitro experiment, the mouse splenocytes and separated T cells were treated with CSP, SPI or SPII (0.5, 1, 2, 4 mg/ml). In vivo experiment, three different *S. herbacea* extracts were orally administrated everyday for one week. For the basic data, body weight and physiological parameters such as organ weight and spleen index were observed. The proliferation of the cells was used as an index for immunomodulating activity and the effect of proliferation was evaluated using MTS assay. The CSP, SPI and SPII directly induced the proliferation of splenocytes and separated T cells in a dose-dependent manner. In results, the proliferation was more increased in the SPI and SPII treated cells than in the CSP treated cells. The best proliferation was shown in the splenocytes cultured with SPI at the concentration of 4 mg/ml for 24 hr. The proliferation of splenocytes and separated T-cells was higher (3.2 and 3.5 times, respectively) than the control. Moreover, when the mouse splenocytes were treated with mitogen, the efficient proliferation was shown in the splenocytes cultured with SPI. In conclusion, polysaccharides from *S. herbacea* showed a substantial immunomodulating activity in the mouse immune cells.

**Key words :** *Salicornia herbacea*, polysaccharides, splenocytes proliferation, immunomodulating activity

### 서 론

현대인은 서구화된 식생활 문화와 더불어 환경 오염, 운동 부족, 스트레스 등의 여러 가지 요인으로 비만 인구 증가 및 심혈관계 질환 등의 만성 성인병 질환이 증가하고 있는 추세이다. 이와 관련하여 우리나라에서는 건강 증진을 위한 생리 활성 물질탐색과 기능성 식품 개발에 관한 연구로서 해양식물에 대한 관심이 증대되고 있는 실정이다[24, 8]. 해양 자원 식물은 항암[2], 면역 증강[21], 혈당 강하[22], 체중 조절[13], 지질 대사 개선[23] 등의 다양한 효과가 있는 것으로 알려지면서 생체 생리 활성 물질을 얻을수 있는 좋은 소재로 각광받고 있다. 최근 이러한 생리 활성 기능이 기대되는 해양자원식물 중 하나인 합초에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 본 연구에서도 합초의 여러 가지 생리 활성 효과 중 면역 증강 효과를 검증해 보고자 한다.

합초(*Salicornia herbacea* L.)는 우리나라 남해안과 서해

안 간척지 바닷가의 염습지대에서 자생하는 명아주과(Chenopodiaceae)에 속하는 일년초 식물로서 우리말로는 통통머디라고 부른다. 갯벌식물인 합초는 다량의 염분을 체내에 축적할 뿐만 아니라 90여 종의 천연 미네랄이 풍부하고 리놀렌산도 약 50%로 다량 함유하고 있으며, 필수 아미노산도 총 아미노산 함량 대비 약 40%를 함유한 것으로 알려져 있다[11]. 또한, 합초에는 식이 섬유소가 50~70% 정도 들어 있어 숙변과 변비를 예방하는 작용도 탁월하다고 알려져 있다[7]. 합초는 중국 의서인 '신농본초경'과 일본의 '대화본초'에 맛이 몹시 짜다고 하여 합초, 염초로 기록되어 있으며 예로부터 민간요법으로 많이 이용되었던 자원식물로서 암, 축농증, 관절염, 고혈압, 요통, 비만증, 치질, 당뇨병, 갑상선염, 천식, 기관지염 및 간 질환 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 체계적인 연구는 아직 미흡한 실정이다. 이와 같이 다양한 약리 작용이 기대되는 합초의 개발은 많은 부가 가치 창출이 기대되나 생리활성에 대한 기초 자료가 부족하므로 과학적이고 실증적인 연구가 필요하다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 합초로부터 조추출물, 다당체I, 다당체II를 얻어 마우스의 면역세포 활성화에 미치는 효과를 규명하고자 한다.

\*Corresponding author

Tel: 82-55-320-3262, Fax: 82-55-334-3426

E-mail: mbslee@inje.ac.kr

재료 및 방법

실험 동물

실험동물은 효창 사이언스로부터 특정병원체부재(specific pathogen free) Balb/c 마우스를 공급받아 사용하였다. 이들 마우스는 1주일간 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 가능한 스트레스를 최소화하여 사육하면서, 생후 7~8주 된 암컷을 사용하였다. 실험 동물의 사육 조건은 실내 온도 25°C, 습도는 50% 전후로 하였고, 명암은 12시간(day light 06:00~18:00)을 주기로 조절하였다. 본 연구는 실험동물의 사육에 대한 인제대학교 동물실험 윤리위원회의 가이드라인을 토대로 진행하였다.

합초(*S. herbacea*)로부터 시료의 추출

본 실험에 사용한 동결건조된 실험재료는 (주)다사랑으로부터 건조된 합초를 구입한 후 분말화하여 사용하였다. 건조된 합초를 잘게 분쇄하여 고온, 가압 조건 하에서 3시간 동안 열수 추출한 후에 filter paper(Whatman No. 1)로 여과하여 조추출물인 Crude *S. herbacea* polysaccharide extract(CSP)를 얻었다. Filter paper 여과 후 고온 가압 멸균시킨 2차 증류수로 Sephadex G-50(Sigma, USA)을 칼럼(2.5 cm x 50 cm, Sigma Chemical Co.)에 충전시켰으며, 충전 후 CSP를 칼럼에 2 mL 주입하여 분당 3 mL 유속으로 2.5 mL씩의 분획을 얻었다. 각각의 분획은 페놀-황산법으로 총 당량을 측정하였고, blue dextran(Sigma, USA)을 standard로 하여 CSP로부터 분리되어 나온 다당체의 분자량을 추정하여 다당체인 *S. herbacea* polysaccharide I(SP I)을 얻었다. 다당체인 *S. herbacea* polysaccharide II(SP II)은 CSP를 한외 여과기(ProFlux M12, Millipore, USA)에서 1 kD membrane(Millipore, USA)을 사용하여 여과한 후에 얻었다(Fig. 1, 2).

시료의 투여

시험관 내 실험에서는 합초의 3개 추출물(CSP, SP I, SP II)을 3차 증류수에 용해시킨 다음 Single Filter Unit

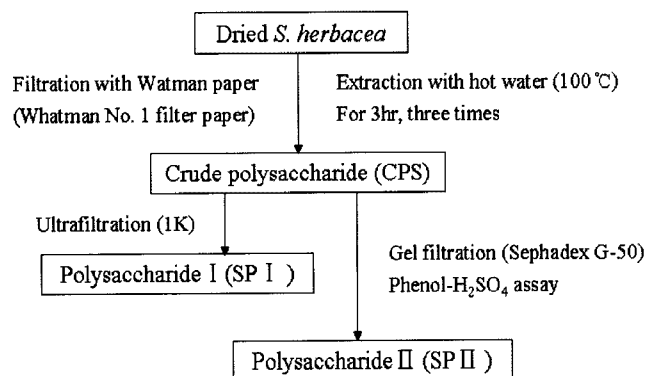


Fig. 1. Purification of polysaccharide from *S. herbacea*.

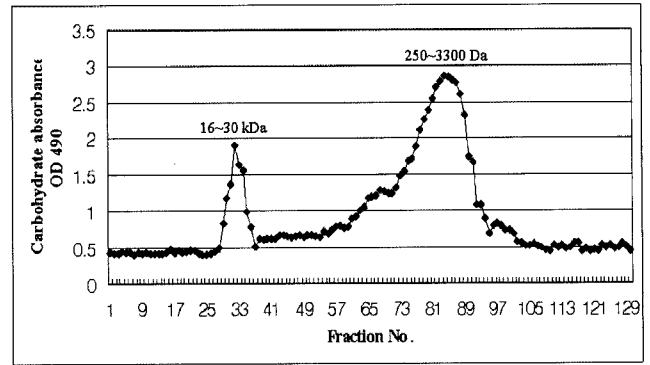


Fig. 2. Gel filtration chromatography of polysaccharide extract of *S. herbacea*. Aliquot of polysaccharide extract dissolved in distilled water was applied to sephadex G-50 column chromatography. Fractions were collected and monitored by phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method.

(Sartorius Minisart®, Germany)으로 여과시킨 후 고온 가압 멸균하여 실험하고자 하는 농도가 되도록 희석하여 세포 배양 시 첨가하였다.

생체 내 실험에서는 합초의 3개 추출물(CSP, SP I, SP II)을 3차 멸균 증류수로 용해시킨 후 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 마우스를 임의 배치법에 의해 대조군과 투여군으로 나누었으며, 실험군마다 6마리씩 사용하였다. 합초의 3개 추출물(CSP, SP I, SP II)을 투여 직전 3차 멸균 증류수에 현탁하여 마우스 체중 10 g당 합초 추출물 현탁액 0.1 mL를 투여할 수 있는 농도로 조제한 다음, LD<sub>50</sub>(25,550 mg/kg)와 EPA의 면역 독성 지침서(U. S. EPA, 1996)를 기준으로 하여 결정된 용량을 하루 1회(200 mg/kg body weight) 7일간 경구 투여하였다. 대조군에는 동량의 3차 멸균 증류수를 같은 방법으로 투여하였다.

비장 세포 분리법

면역세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 마우스의 비장을 이용하였다. 먼저 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640으로 씻은 다음 핀셋과 멸균 슬라이드를 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI 1640으로 2회 세척한 다음 lysing buffer(BD PharmLyse™ Lysis Buffer)에 3분간 현탁시켜 적혈구를 제거하고 다시 원심 세척한 다음 5 x 10<sup>5</sup> cells/mL 농도가 되게 희석한 후 96 well plate에 well 당 90 uL씩 첨가하여 세포 증식능 측정에 이용하였다.

T세포 분리법

분리한 마우스의 비장 세포를 10% FBS-RPMI 1640배지 1 mL에 희석하여 nylon wool column(Polysciences, Inc.)에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 60분간 배양한 후, nylon wool column을 37°C로 미리 데워진 배지로 세척하여 비부착성인 T세포만을 순수 분리하여 사용하였다[25].

시험관 내에서 세포 증식 측정법

준비된 96 well plate에 세포 90 uL와 최종 농도가 0.5, 1, 2, 4 mg/mL가 되도록 조제된 각각의 추출물을 10 uL씩 각 well에 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24, 48, 72시간 배양하였다. 세포 증식 측정은 Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, USA)를 사용하였으며, 세포 배양액 100 uL에 Cell titer 용액을 20 uL씩 첨가하여 4시간 동안 배양한 다음 Fluorescence Multi-Detection Reader(Synergy HT, BIOTEK, USA)로 490 nm에서 O.D.값을 측정하여 증식 정도를 측정하였다.

실험 동물의 체중 측정 및 장기 중량 측정

모든 실험 동물에 대한 체중은 시험 물질 투여 개시 직전에 1회 측정하였고, 투여 개시 이후에는 매일 1회씩 동일한 시간에 측정하였다. 실험 종료 후 실험 동물에 대해 urethane (3 g/kg body weight; Sigma Chemical Co., St. Louis)을 복강에 주사하여 마취하여 복강을 절개하여 주요 장기인 간장, 신장(좌, 우), 흉선, 비장을 적출하여 중량을 측정하였다.

비장 지수(spleen index) 산정

무균적으로 비장을 적출하여 비장의 무게를 측정한 뒤, 실험 동물 체중의 차이에 따른 변이를 없애고 이를 표준화하기 위하여 적출 비장의 무게와 마우스의 체중을 바탕으로 아래의 공식에 따라 비장 지수를 구하였다[4].

$$\text{비장 지수} = \frac{\text{비장 무게(g)} \times 100}{\sqrt{\text{마우스 몸무게(g)}}$$

경구 투여에서 세포 증식 측정법

준비된 96 well plate에 세포를 90 uL씩 분주하고 각 군당 양성 대조군으로서 concanavalin A(Con A, 5 ug/mL)와 lipopolysaccharide(LPS, 15 ug/mL)를 각각 10 uL씩 분주하고 대조군에는 3차 멸균 증류수를 동량 분주한 후, 각 plate는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24, 48, 72시간 배양하였다. 세포 증식 측정은 Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, USA)를 사용하였으며, 세포 배양액 100 uL에 Cell titer 용액을 20 uL씩 첨가하여 4시간 동안 배양한 다음 Fluorescence Multi-Detection Reader(Synergy HT, BIOTEK, USA)로 490 nm에서 O.D. 값을 측정하여 증식 정도를 측정하였다.

통계 분석

모든 실험 결과는 통계 프로그램인 SAS(Statistic Analysis System)를 이용하여 평균과 표준 편차를 구하였다. 통계 처리는 one-way analysis of variance(ANOVA)에 의해 수행하였고  $p < 0.05$  수준에서 Student *t*-test에 의해 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

함초로부터 조추출물 및 다당체 추출

함초 조추출물인 Crude *S. herbacea* polysaccharide extract (CSP)를 sephadex G-50으로 충전된 칼럼에 주입하여 gel filtration chromatography로 다당체 분획을 확인하였으며, 이

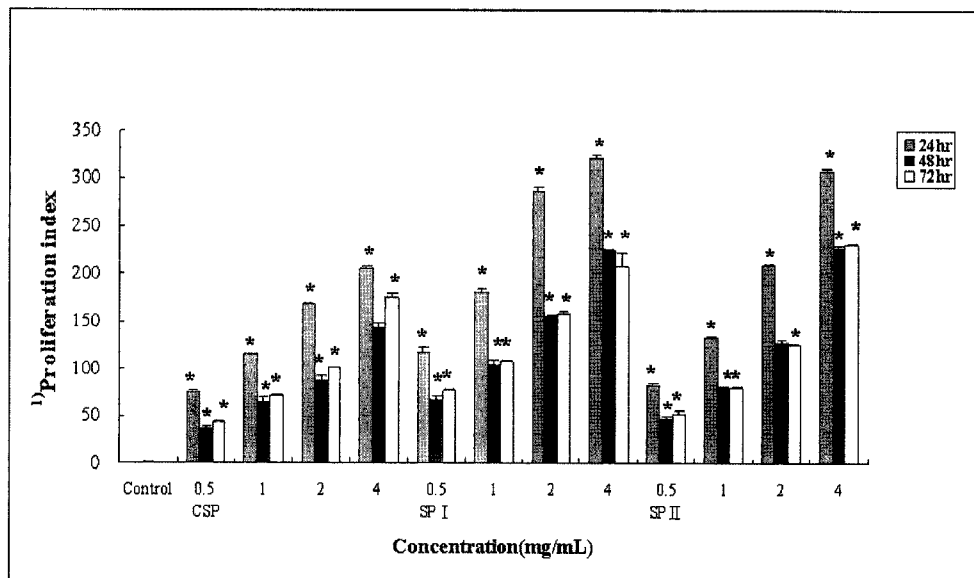


Fig. 3. Cell proliferation of CSP, SPI and SPII on the mouse splenocytes. Splenocytes were treated with different concentration of CSP, SPI and SPII for 24, 48 and 72 hr. The results are represented as a proliferation index. Data values are expressed as mean ± SD (n=6). Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group (\* $p < 0.05$ ). <sup>1</sup>Proliferation (%) = (Mean of O.D. in test wells/ Mean of O.D. in control wells - 1) × 100. CSP : Crude *Salicornia herbacea* polysaccharide extract, SPI : *S. herbacea* polysaccharide I. SPII : *S. herbacea* polysaccharide II.

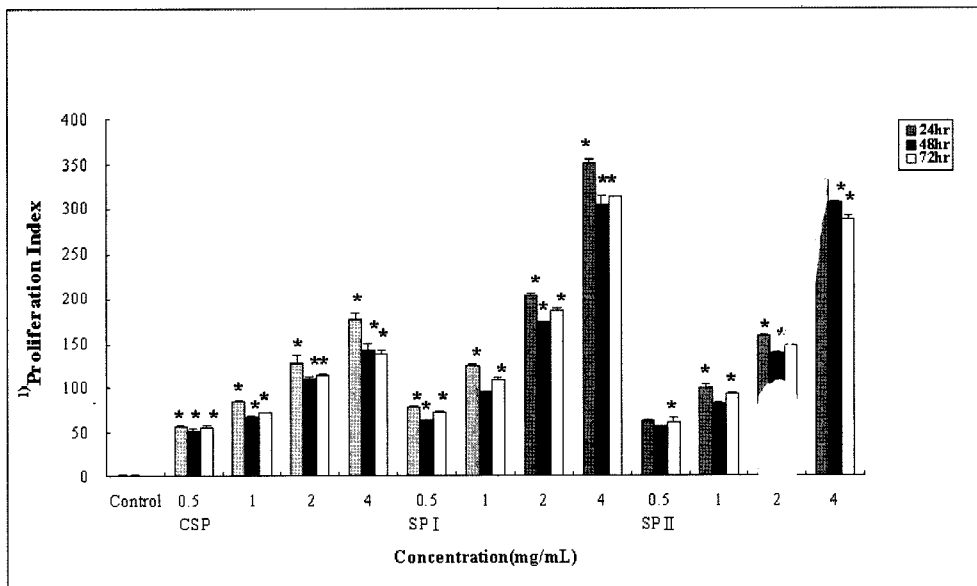
분획은 페놀-황산법으로 총 당량을 측정하여 16~30 KDa와 250~3300 Da의 분자량으로 추정되었다(Fig. 2). 상기의 분자량을 포함한 다당체 혼합물을 얻기 위하여 CSP를 1kD membrane을 사용하여 한외 여과시킨 후 *S. herbacea* polysaccharide I(SPI)을 얻었으며, CSP를 gel filtration chromatography시킨 후 다당체로 추정되는 해당 분획을 수집하여 *S. herbacea* polysaccharide II(SP II)를 얻었다(Fig. 1). 함초 추출물의 SPI 활성은 선행 연구 결과[17]에서 보고한 바와 같이 항당뇨 및 지질 대사 개선 등의 효과가 있음이 확인된 바 있다.

**시료의 첨가가 비장 세포 증식능에 미치는 영향**

**비장 세포의 증식:** 비장(spleen)은 혈액에서 유래되는 항원에 대한 주된 보호 면역 반응 부위로 B 및 T 림프구의 성숙과 항원의 자극에 의한 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프 기관으로 비장 내 림프구의 증식은 면역 시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다[5]. 비장 세포의 증식반응을 알아보기 위하여, 분리한 비장 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well로 넣고 시료를 농도별로 첨가하여 24, 48 및 72시간 배양하여 증식 정도를 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 함초 추출물을 첨가하여 배양한 경우 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 농도 의존적으로 비장 세포의 증식 반응이 나타났다. 함초 추출물에 의한 비장 세포 증식능의 변화를 살펴보면, 4 mg/mL 농도에서 24시간 배양한 경우 CSP, SPI, SP II군 모두 세포 증식능이 205.01, 320.62, 307.32 수준으로 향상되어 유의적인 수치를 나타내었다. 특히 SP I과 SP II군이 CSP군보다 세포 증식능이 효과적이었다. 다당체와 관련하여 Kim

등[15]은 상백피로부터 분리한 다당체의 경우 면역 세포인 B 및 T 세포의 증식을 최대 6.7배 촉진시키는 효과가 있음을 보고하였고, Kang 등[14]은 큰느타리버섯 조다당체가 비장 세포 및 B 세포 증식을 직접적으로 유도한다고 보고하였다. 이상의 결과와 본 연구의 결과로 판단하면 함초 추출물 중 특히 SP I과 SP II가 비장 세포를 자극하여 T 세포와 B 세포 증식을 촉진하여 면역능을 증진시키는 것으로 사료된다.

**T 세포의 증식:** 위 실험에서 함초 추출물이 비장 세포의 증식을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이때, 증식하는 비장 세포는 T 세포 또는 B 세포 중 하나일 가능성이 높다. Dutton 등[6, 19]이 보고한 바와 같이 우리 몸의 전체 림프구 중 비장에 분포되어 있는 림프구는 T 세포가 60%, B 세포가 30% 정도로 T 세포의 비율이 높다. 따라서, 비장 세포에서 T세포만을 따로 분리하여 함초 추출물을 첨가한 후에 직접적으로 증식 반응을 유도하는지를 알아보았다. Nylon wool을 이용하여, 비장세포 중에서 부착성을 가진 B세포와 대식 세포를 제거한 다음, 순수한 T세포만을 분리하여  $5 \times 10^5$  cells/well을 넣고 시료를 농도별로 첨가하여 24, 48 및 72시간 배양하여 증식 정도를 측정하였다. Fig. 4에 나타난 것과 같이, 분리된 T 세포는 함초 추출물을 첨가하여 배양한 경우 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 농도 의존적으로 세포 증식 반응이 나타났으며, 함초 추출물에 의한 T 세포 증식능의 변화를 살펴보면, 4 mg/mL 농도에서 24시간 배양한 경우 CSP, SPI, SP II군 모두 세포 증식능이 176.76, 350.39, 330.08 수준으로 향상되어 유의적인 수치를 나타내었다. 특히 SP I과 SP II군이 CSP군보다 세포 증식능이 효과적이었다. 적응 면역에는 B 세포에 의해 생성되는 체액성



**Fig. 4. Cell proliferation of CSP, SPI and SPII on the separated T Cell of mouse splenocytes.** T Cells were treated with different concentration of CSP, SPI and SPII for 24, 48 and 72 hr. The results are represented as a proliferative index. Data values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6). Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group (\* in test wells/Mean of O.D. in control wells - 1)  $\times$  100. CSP : Crude *Salicornia herbacea* polysaccharide I, SPI : *S. herbacea* polysaccharide I, SPII : *S. herbacea* polysaccharide II.

면역과 T 세포에 의해 매개되는 세포성 면역의 두 유형이 있는데, 함초 추출물 중 특히 SP I과 SP II가 T 세포를 자극하여 세포 증식을 촉진시킨 것으로 보아 세포성 면역에 자극효과가 우수함을 확인할 수 있었으나, B 세포와 관련이 있는 체액성 면역과 T 세포와 관련이 있는 세포성 면역 중 어떤 반응을 더 효과적으로 유도하는지에 대해서는 알 수 없었다. 이와 관련하여 보다 구체적인 것은 추후 실험을 수행하여야 할 것으로 사료된다.

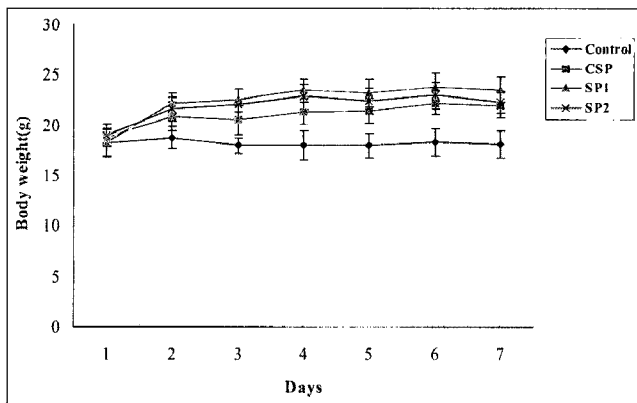
**시료의 경구투여가 비장 세포 증식능에 미치는 영향**

체중 및 장기 무게의 변화: 실험 기간 동안 실험 동물의 체중 증가량을 관찰할 결과는 Fig. 5와 같다. 체중 증가량은 함초 추출물을 공급하지 않은 대조군과 함초 추출물을 공급한 실험군 간에 유의적 차이는 없었으나 실험 기간 동안 실험군의 체중이 계속적으로 증가하는 경향을 보였다. Jo 등 [13]의 연구에 의하면 함초 추출액 투여 시 투여량이 증가할수록 체중 증가율이 감소되어 함초가 체중 증가 억제에 영향을 미친다고 보고한 것과 달리 본 실험 결과에서 체중 증가 경향을 보인 것은 실험군의 식이 조성이 양호하고 실험 마우스의 성장 발육이 활발한 시기 때문으로 사료된다. 이는 함초 첨가 식이군이 정상식이군에 비해 체중 증가량을 보

인 Cho 등[1]의 보고와 유사하다. 그리고 각 실험군의 장기 중량을 관찰할 결과는 Table 1과 같다. 즉, 간장 중량, 신장 중량 및 흉선 중량은 각 군간에 다소 차이는 있으나 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으며, 비장 중량은 대조군(0.077±0.006), CSP군(0.097±0.021), SP I군(0.095±0.021), SP II군(0.080±0.014)으로 나타나 정상 대조군에 비해 함초 추출물 투여군이 다소 증가 경향은 보였으나 유의적 차이는 없었다.

비장 무게: 비장 지수(spleen weight index)는 비장의 무게를 표준으로 환산하여 측정지표로 삼는 것으로 비장의 무게에 대한 체중의 비로 나타낸다[16]. 세포 매개성 면역반응인 GVH 반응(graft-versus-host reaction)에서는 비장의 비정상적인 증대가 양성 반응의 지표로 활용되므로 spleen index가 1.3 이상일 때 양성 반응으로 결정하기도 하고[18], 각 실험군마다 spleen weight index를 구하여 대조군의 값과 비교하여 이상 유무를 판단하기도 한다[26]. 본 연구에서 측정된 대조군과 실험군의 spleen weight index 및 spleen index는 Table 2와 같다.

비장 세포 증식능 측정: 식이 섭취가 생체 내에 미치는 영향을 알아보기 위한 방법으로 장기 또는 혈액을 채취하여 시험관 내 실험을 하는 연구가 다양하게 진행되고 있다[9, 10]. 이 중 비장 세포는 혈액에서 유래된 항원에 대한 면역 반응이 개시되고 발전되는 부위로서 말초 림프 기관에 속하며,



**Fig. 5. Change of body weight in Balb/c mouse with age.** Data values are expressed as mean ± SD (n=6). Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group (\**p*<0.05). CSP : Crude *S. herbacea* polysaccharide extract, SPI : *S. herbacea* polysaccharide I. SPII : *S. herbacea* polysaccharide II.

**Table 2. Spleen index of the mouse orally administered with three different extracts of *S. herbacea*.**

Group (200mg/kg bw)	<sup>1</sup> Spleen-weight index	<sup>2</sup> Spleen index
Control	0.423±0.032	
CSP	0.440±0.095	1.057±0.315
SPI	0.404±0.090	0.972±0.127
SPII	0.359±0.063	0.813±0.144

Data values are expressed as mean ± SD (n=6). Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group (\**p*<0.05)

<sup>1</sup>Spleen-weight index = Spleen weight (g)/Body weight (g)×100

<sup>2</sup>Spleen index = Mean of (Spleen-weight index) in test group/Mean of (Spleen-weight index) in control group

CSP : Crude *S. herbacea* polysaccharide extract, SPI : *S. herbacea* polysaccharide I, SPII : *S. herbacea* polysaccharide II.

**Table 1. Organ weight in Balb/c mouse.**

Organ	Control	CSP	SPI	SPII
Liver	0.947±0.051	0.973±0.095	0.980±0.071	1.000±0.085
Kidney (L)	0.147±0.006	0.147±0.006	0.150±0.000	0.140±0.014
Kidney (R)	0.153±0.006	0.153±0.006	0.160±0.014	0.155±0.007
Thymus	0.040±0.010	0.037±0.006	0.035±0.007	0.035±0.007
Spleen	0.077±0.006	0.097±0.021	0.095±0.021	0.080±0.014

Data values are expressed as mean ± SD (n=6).

Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group (\**p*<0.05).

CSP : Crude *Salicornia herbacea* polysaccharide extract, SPI : *S. herbacea* polysaccharide I, SPII : *S. herbacea* polysaccharide II.

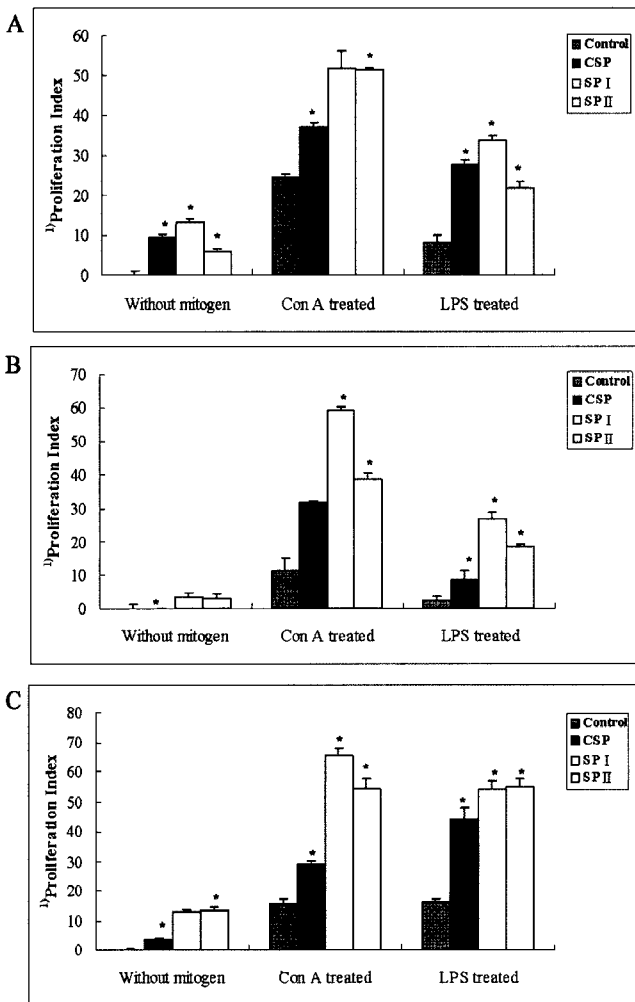
그 크기나 세포의 수가 직접적인 지표로 이용될 수 있으므로 대표적인 면역 지표로 사용된다[26, 12]. 시험관 내 실험 결과 함초 추출물이 마우스 비장 세포 및 T 세포 증식능에 영향을 미치는 것으로 나타났으므로, 이 결과를 바탕으로 함초 추출물을 마우스에 경구 투여하여 비장 세포 증식능을 관찰하였다. 먼저, 함초 추출물을 투여한 군과 투여하지 않은 대조군으로 나누어 비장 세포 증식능을 측정하였고, 세포 배양 시 mitogen(림프구 비특이 활성화제)인 Con A(5 ug/mL)와 LPS(15 ug/mL)를 각 well에 첨가하였고 이에 대한 대조군으로 mitogen 대신 3차 증류수를 동량 첨가하여 비장 세포 증식 계수를 구하여 비교하였다. 마우스에서 분리한 비장 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well로 넣고 mitogen을 첨가하여 24, 48

및 72시간 배양하여 증식 정도를 비교한 결과는 Fig. 6과 같다. B세포의 증식을 특이적으로 유도하는 LPS와 T 세포의 증식을 특이적으로 유도하는 Con A에 의해서 비장 세포는 72시간 배양 후 유의적으로 최대 증식 반응을 나타내었다. 그리고, 함초 추출물을 투여하고 mitogen을 처리하지 않은 경우에는 세포 증식능이 저하되었으나, Con A나 LPS로 처리 시에는 72시간 배양 시 SPI 군에서 각각 최대의 증식능 ( $65.38 \pm 2.55$ ,  $54.55 \pm 2.86$ )을 보였다. 특히 SPI와 SPIII군 CSP군보다 세포 증식능이 효과적이었다. 이는 함초 추출물의 투여로 인해 세포성 면역이 증가하고, 체액성 면역도 영향을 받는 것으로 사료된다. 한편, mitogen과 관련하여 Cho 등[3]은 다시마 분말 투여에 의한 당뇨쥐의 비장 세포 기능에 관한 연구에서 4주간의 투여에 의해 비당뇨군의 비장 세포 증식능이 촉진되었고, 특히 LPS와 Con A 첨가에 의해 비장 세포 증식능이 3배까지 상승하였음을 보고하였으며, Kwon 등[20]은 동충하초를 4주간 투여한 마우스의 비장 세포를 미토젠과 같이 배양 시 비장 세포 증식능이 상승하였음을 보고하였다.

이상의 결과로부터 함초에서 추출된 다당체 SPI와 SPIII는 면역활성을 증강시키는 실질적 효과가 있음이 확인되었으며, 이로써 앞으로 이 다당체가 면역 증강 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 요 약

함초(*Salicornia herbacea*)는 염습 지대에서 자생하는 명아주과에 속하는 일년초 식물로서 우리말로는 통통마디라고 불리우며, 식용과 약용으로 이용되고 있다. 건조된 함초로부터 열수 추출을 하여 조추출물(CSP)을 얻었으며, 조추출물을 한외 여과 및 gel 여과를 통해 다당체 I(SPI)과 다당체 II(SPII)를 얻었다. 이렇게 얻은 함초 추출물들은 마우스 면역 조절 활성을 확인하는 데 사용되었고, 실험은 시험관 내 실험과 생체 내 실험으로 나누어 진행되었다. 시험관 내 실험에서는 7~8주 된 Balb/c 마우스로부터 비장 세포와 T 세포를 분리하여 시료를 농도별(0.5, 1, 2, 4 mg/mL)로 처리한 후 일정 시간 배양하여 MTS assay를 통해 세포 증식능을 확인한 결과, 비장 세포와 T 세포에서 각각 4 mg/mL 농도로 24시간 배양한 경우 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 SPI이 3.2, 3.5배로 유의적인 세포 증식 활성을 나타내었다. 생체 내 실험에서는 7~8주 된 Balb/c 마우스를 대조군과 투여군으로 나누어 7일 동안 경구 투여를 실시하였는데, 실험 종료 후 비장 세포를 적출하여 mitogen을 이용한 세포 증식능을 확인한 결과, SPI을 경구 투여한 비장 세포가 가장 높은 세포 증식능을 보였다. 즉, 함초로부터 조추출물과 다당체를 획득하여 이들에 대한 면역 활성능을 확인한 결과, 조추출물과 다당체에서 면역 세포 활성 증강 효과를 보였는데, 조추출물보다 다당체에서 더 높은 활성을 보



**Fig. 6.** Effect of mitogen on the proliferation of splenocytes isolated from mouse orally administrated with the three different extracts of *S. herbacea*. Splenocytes were treated with mitogen for 24 (A), 48 (B) and 72 hr (C). The results are represented as a proliferation index. Data values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=6). Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group (\**p*<0.05). <sup>1</sup>Proliferation (%) = (Mean of O.D. in test wells/Mean of O.D. in control wells - 1)  $\times$  100. CSP : Crude *Salicornia herbacea* polysaccharide extract, SPI : *S. herbacea* polysaccharide I, SPII : *S. herbacea* polysaccharide II.

였다. 따라서 함초 다당체는 면역 증강 활성을 가진 바이오 헬스 소재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 산업자원부·한국산업기술평가원 지원 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터의 지원을 일부 받았습니다.

### 참고문헌

- Bang, M. A., H. A. Kim, and Y. J. Cho. 2002. Hypoglycemic and antioxidant effect of dietary hamcho powder in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Food Sci. Nutr.* **31**: 840-846.
- Cho, K. J., Y. S. Lee, and B. H. Ryu. 1990. Antitumor effect and immunology activity seaweeds toward sarcoma-180. *J. Korean Fish.* **23**: 345-352.
- Cho, S. H., K. M. Yang, B. S. Bae, S. A. Im, and R. N. Yu. 1998. Effect of sea tangel intake on cytokine production in macrophage from normal and diabetic mice. *J. Korean Food Sci. Nutr.* **27**: 952-959.
- Collins, F. M., C. C. Congdon, and N. E. Monrison. 1975. Growth of mycobacterium bovis (BCG) in T lymphocyte-depleted mice. *Infect. Immun.* **11**: 57-64.
- Cyster, J. G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286**: 2098-2102.
- Dutton. R. W., L. M. Bradley, and S. L. Swain. 1998. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 201-223.
- Han, S. H., M. S. Kim, and B. S. Pyo. 2003. Antioxidative effect of glasswort(*Salicornia herbacea* L.) on the lipid oxidation of pork. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **23**: 46-49.
- Han, S. K. 2004. Antioxidative effect of fermented *Salicornia herbacea* L. liquid with EM (effective micro-organism) on pork. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **24**: 298-302.
- Hasegawa, T., K. Ito, S. Ueno, S. Kumamoto, Y. Ando, A. Yamada, K. Nomoto, and Y. Yasunobu. 1999. Oral administration of hot extract of *Chlorella vulgaris* reduce IgE production against mile casein in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **21**: 311-323.
- Hiroichi, N., N. Takeshi, O. Takeshi, I. Yoshiki, T. Hiroyuki and I. Naoki. 1999. The effect of methanolic extract from *Corydalis tuber* on cytokine production and allergic reactions in experimental animal. *J. Trad. Med.* **16**: 51-58.
- Ihm, B. S. and J. S. Lee. 1986. The strategies of *Salicornia herbacea* and *Suaeda japonica* for coping with environmental fluctuation of salt marsh. *Korean J. Environ. Biol.* **4**: 15-25.
- James, G. L. 1995. *Method. Immunotoxicol.* (John Wiley-Liss, Inc, San Diego) **2**: 15.
- Jo, Y. C., J. H. Ahn, S. M. Chon, K. S. Lee, T. J. Bea, and D. S. Kang. 2002. Studies on pharmacological effects of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean J. Medicinal Corp. Sci.* **10**: 93-99.
- Kang, H. I., J. Y. Kim, K. D. Moon, K. I. Seo, Y. S. Cho, S. D. Lee, and S. T. Yee. 2004. Effect of the crude polysaccharide of *Pleurotus eryngii* on the activation of immune cells. *J. Korean Food Sci. Nutr.* **33**: 1092-1097.
- Kim, C. Y., E. J. Lee, H. M. Kim, and H. Huh. 1998. Isolation of lymphocyte proliferating polysaccharide from *Mori cortex Radicis. Yakhak Hoeji.* **42**: 467-471.
- Kim, J., H. S. Ryu, J. H. Shin, and H. S. Kim. 2005. In vitro and Ex vivo Supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice. *J. Korean Food Sci. Nutr.* **34**: 167-175.
- Kim, S. H., D. S. Ryu, M. Y. Lee, K. H. Kim, Y. H. Kim, and D. S. Lee. 2008. Anti-diabetic activity of polysaccharide from *Salicornia herbacea*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 43-48.
- Kuby, J. 1997. Immunology 3rd ed. *WH Freeman & Co.*, New York.
- Kupper, T. S. 2000. T cells, immunosurveillance, and cutaneous immunity. *J. Dermatol. Sci.* **1**: 41-45.
- Kwon, S. H., H. J. Woo, D. S. Han, and M. K. Kim. 2001. Effect of dried powders and water extracts of *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, antioxidative capacity and immune status in rats. *Korean J. Nutr.* **34**: 271-284.
- Lee, E. J. and M. K. Sung. 2001. Effect of fiber-rich sea mustard feeding on AOM-induced colon aberrant crypt formation and colonic cell proliferation in Sprague Dawley rats. *J. Korean Food Sci. Nutr.* **30**: 535-539.
- Lee, H. S., M. S. Choi, Y. K. Lee, S. H. Park, and Y. J. Kim. 1996. A study on the development of high-fiber supplements for the diabetic patients(2)-effect of seaweed supplementation on the lipid and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.* **29**: 296-306.
- Lee, K. S., J. S. Seo, and Y. S. Choi. 1998. Effect of sea tangle and hypoglycemic agent on lipid metabolism in diabetic rats. *J. Korean Food Sci. Nutr.* **27**: 960-967.
- Park, S. H., H. S. Hwang, and J. H. Han. 2004. Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function. *Korean J. Nutr.* **37**: 364-372.
- Yee, S. T., T. Kato, T. Tamura, and H. Nariuchi. 1994. Different requirements of CD3 cross-linkage for the activation of memory and naive CD8<sup>+</sup> T cells. *Cell Immunol.* **157**: 48-58.
- Zalys, R., I. S. Zagon, R. H. Bonneau, C. M. Lang, and P. J. McLaughlin. 2000. In vivo effect of chronic treatment with (MET5)-enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Sci.* **66**: 829-834.

(Received May 2, 2008/Accepted June 8, 2008)