

민들레 뿌리 물 추출물의 마우스 선천 및 획득 면역계에 미치는 효과

†윤 택 준
유한대학 식품영양학과

Effect of Water Extracts from Root of *Taraxacum officinale* on Innate and Adaptive Immune Responses in Mice

†Taek-Joon Yoon

Dept. of Food & Nutrition, Yuhan College, Bucheon 422-749, Korea

Abstract

Hot-water (100°C) and cold-water (4°C) extracts of *Taraxacum officinale* root were assessed for the effects of innate and adaptive immune responses in mice. Hot water extracts (TO-100) and cold water extracts (TO-4) did not affect the viability of macrophages at concentrations below to 18 mg/ml and 8 mg/ml, respectively. The thioglycollate-induced macrophages cultured with TO-100 and TO-4 produced a significantly higher quantity of various cytokines, such as IL-6 and IL-12, than those treated with medium. This shows that the extracts potently stimulated the innate immune response. When mice were subcutaneously immunized(sc) with OVA+FIA (Freund's incomplete adjuvant)-emulsified TO-100, TO-100 did not affect the production of IgE, but enhanced the production of IgG1, IgG2a and IgG2b. The culture supernatant obtained from the splenocytes of mice treated with OVA+FIA-emulsified TO-100 also evidenced elevated levels of both OVA-specific Th1-type (IFN- γ) and Th2-type cytokines (IL-4, IL-6 and IL-10). These results suggested that TO-100 can modulate the immune responses to allergens in mice.

Key words: *Taraxacum officinale*, innate and adaptive immunity, antibody, cytokine.

서 론

외래 물질에 대한 면역 감시 체계는 크게 두 가지로 분류하고 있다. 즉, 선천적 면역계(innate immunosurveillance)와 획득 면역계(adaptive immunosurveillance)이다¹⁾. 선천적 면역계는 감염에 대한 1차 방어선으로 상피 장벽, 대식세포(macrophage) 및 자연 살해 세포(natural killer cell; NK cell) 등을 포함하는 백혈구, 보체 등의 순환 단백질 및 cytokines 등으로 구성되며, 외래 물질에 대한 적응 면역이 발생하기 전에 신속하게 반응하여 외래 물질을 무력화시키는 특징을 가진다²⁾. 선천 면역계에서 생체 방어 기구의 최전선을 담당하는 대식세포(macrophage)의 방어 기전과 관련된 수용체는 미생물을 인식하고 살해하는 탐식 패턴 인식 수용체(endocytic pattern-recognition

receptors) 및 면역계의 활성화를 조절하는 신호 패턴 인식 수용체(signaling pattern-recognition receptors)로 나뉠 수 있다^{3,4)}. 즉, 탐식 패턴 인식 수용체에 인식된 외래 물질은 포식세포(phagocytes)에 의하여 살해되며, 신호 패턴 인식 수용체에 인식된 물질들은 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-12와 같은 여러 가지 cytokine들을 생산함으로써 선천 면역 및 적응 면역계에 항원 제시를 하는 작동 세포의 활성화에 관여한다^{3,4)}. 획득 면역은 항원 제시 세포가 포식하여 제시한 항원을 T-세포가 인식하면서 이루어진다^{3,5)}. 이러한 획득 면역 반응은 주로 외인성 항원에 제거하는 수단으로 B-세포가 생산하는 항체에 의한 체액성 면역 반응과 내인성 항원에 의하여 감염된 정상 세포를 살해하는 능력을 지닌 세포 독성 T-세포가 관여하는 세포성 면역 반응으로 나누어진다⁶⁾. 이러한 면역 반응은 항원

† Corresponding author: Taek-Joon Yoon, Dept. of Food & Nutrition, Yuhan College, Bucheon 422-749, Korea.
Tel: +82-2-2610-0804, Fax: +82-2-2610-0809, E-mail: yoon_tj@yuhan.ac.kr

을 포획한 항원 제시 세포가 생산하는 cytokine 및 항원 제시 세포로부터 항원을 제시 받은 조력 T-세포가 생산하는 항원 특이적 cytokines에 의하여 조절되어진다³⁻⁶). 즉, 생체는 외부 항원과 같은 외래 물질의 침입 혹은 감염에 대하여 선천 면역계 및 적응 면역계가 적절하게 대항하여 항상성을 유지하게 되어 있다. 그러나 최근의 위생 가설(hygiene hypothesis) 이론에 의하면 경제적으로 발전된 나라에서 아토피성 피부염과 알레르기 빈도가 증가하고 있다⁷). 이러한 면역 과민 반응이 주로 선진국에서 나타나는 이유를 환경적 요소, 즉, 소아기 감염 질환에 대한 노출의 변화, 환경 오염 및 식습관 변화 등에 의하여 외래 물질에 대한 노출에 대항하는 면역 방어 기구의 균형이 변화하여 면역 과민 반응이 증진하는 것으로 설명하고 있다⁷⁻⁹). 이러한 면역 균형이 변하는 현상은 항원에 대하여 조력 T-세포가 생산하는 Th1 형 및 Th2형의 cytokines의 생산 균형이 주로 Th2 형으로 이동될 경우에 나타나는 것으로 알려져 있다^{7,10}). 현대에서 아토피, 알러지 등의 과민 반응이 증가하는 이유 중에서 식습관의 변화에 의한 장내 균총의 변화는 가장 중요한 원인 중의 하나로 인식되고 있기에¹¹), 현재 면역 과민 반응의 극복을 위한 방편의 하나로 과거 형태의 식습관의 중요성이 부각되고 있다.

민들레(*Taraxacum officinale*)는 포공영이란 생약명을 가지는 다년생 식물로서 한방에서는 강장, 해열, 이뇨, 건위, 거담, 해독 등에 사용하였고, 서양에서는 항산화, 항균, 담즙 분비 촉진, 항류마티스 및 이뇨 등에 사용할 수 있는 약제로 사용한 바, 동서양에서 오래전부터 여러 가지 질병에 대하여 민간에서 유용하게 사용하여 온 약용 식물 중의 하나이다¹²⁻¹⁶). 그럼에도 불구하고 여전히 여러 가지 생리 활성에 대한 기전이나 지표 물질에 대한 연구가 부족한 실정이어서 이에 관한 자세한 연구가 필요한 시점이다^{15,16}). 따라서 본 연구는 민들레 뿌리 추출물의 선천 면역계에 작용하는 면역 자극 효과를 대식세포로부터 cytokine의 생산능력으로 검토하였으며, 단백질 항원인 OVA에 대한 획득 면역 반응에 미치는 효과를 항원에 대한 항체의 subisotype을 검토함으로써 민들레 뿌리의 기능성 소재로의 개발 가치 및 적용 가능성에 대한 기초 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 6~8주령의 자성 BALB/c를 (주)중앙실험동물에서 분양 받아 유한대학 실험동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 5~10마리씩 넣어 정수된 물과 실험동물용 펠릿사료(Samyang Co, Ltd, Incheon, Korea)를 자유 공급하였고, 온도는 22°C, 습도 50%, 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에

서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

2. 민들레 추출물 제조

민들레의 추출물을 총 2가지 방법으로 준비하였다. 즉, 민들레의 뿌리부분 10 g에 증류수 100 mL를 첨가한 후 믹서기(Hanil Co, Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 물질을 분쇄 후에 각각 4°C에서 10시간 및 100°C에서 4시간 동안 침지, 추출하였다. 각각의 추출물은 원심분리(1,800×g, 30 min)를 실시하므로 상등액과 침전물로 구분하고 수용성 성분을 얻기 위하여 상등을 회수 후 0.2 μm의 pore size를 가지는 membrane filter(Whatman, Philadelphia, PA, USA)를 이용하여 filter 후에 4°C에 보관하였다.

3. 시료의 총 단백질 및 중성당 함량 측정

민들레로부터 추출한 각 시료들의 총 단백질 함량은 단백질 분석 kit(Bio-Rad, NY, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 단백질 함량 측정은 표준물질로 BAS를 이용하였으며, 총 중성당 함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 phenol-sulfuric acid 방법¹⁷)으로 측정하였다.

4. 세포배양 및 세포 독성 조사

3% thioglycollate를 복강주사하여 얻은 대식세포의 배양은 7.5% fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 EMEM 배지를 Gibco(Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하여 사용하였으며, 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기(Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)에서 배양하였다. 시료의 세포 독성 조사를 위하여 1×10⁵/well의 밀도로 대식세포를 96-well plate의 각 well에 plating 하였고, 100°C 추출물의 경우 150 mg/mL부터, 4°C 추출물의 경우 75 mg/mL부터 3배 희석법으로 희석된 민들레 뿌리 추출물을 100 μL씩 첨가하고 2일간 배양하였다. 각 물질의 세포 독성 효과는 WST-1을 이용하는 cell counting kit(EZ-Cytox, DAEILLAB SERVICE, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Macrophage로부터 Cytokine의 유도 분비 조사

BALB/c 마우스에 3% thioglycollate를 1 mL 복강주사하고 3일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10 mL를 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수획한 PEC를 24 well culture plate에 1.5×10⁶/mL의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착 후, 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 그 후 적정농도로 조정된 민들레 뿌리 추출물을 첨가하고 24시간 동안 배양

하였다. 배양완료 후, macrophage의 배양 상등액을 회수하였고, 배양 상등액에 유도 분비된 TNF- α , IL-6 및 IL-12의 측정 은 각 cytokine에 대한 ELISA kit(Pharmingen, San Jose, CA, USA)을 구입하여 조사하였다.

6. 마우스의 면역 및 항혈청의 수집

항체 생산을 위한 항원으로 ovalbumin(OVA; Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. 각 항원에 대한 항체의 생산을 위하여 6주령의 BALB/c 마우스에 10 μ g의 OVA 단독 혹은 민들레 뿌리 열수 추출물(1 mg/mouse)를 혼합한 군, OVA의 FIA 유화 군 및 OVA에 민들레 뿌리 추출물을 혼합한 후 FIA에 유화한 군 등으로 면역원을 제조하였다. 각 면역원은 2주 간격으로 총 2회 면역하였고, 최종 면역 10일 후에 항원인 OVA(10 μ g)를 boosting 면역하였다. 항혈청의 수집은 boosting 면역 5일 후에 각 마우스로부터 채혈한 혈액으로부터 혈청을 분리하여 준비하였으며, 항체가의 측정 시까지 -20°C 에 보관하였다.

7. 항체가 측정 및 항체의 Subisotype의 결정

혈청에 존재하는 각 항원에 대한 총 항체가의 측정은 ELISA 법으로 측정하였다. Flat-bottomed microtiter plate(Nunc, NY, USA)의 각 well에 50 μ g/ml의 각 항원을 well 당 100 μ l씩 분주 하고 항원의 coating을 위하여 4°C 에서 16시간 동안 부착시켰다. PBS-Tween 20(0.05%; PBST)으로 각 well을 3회 세척 후에 3% skim milk를 이용하여 blocking하고 PBST로서 다시 세척 하였다. 준비한 각각의 항원에 대한 혈청을 100배부터 2배 희석법으로 희석하여 각 well에 첨가하고 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 면역 글로블린 subisotype의 분석은 마우스 면역 글로블린의 각 subisotype에 대한 특이적인 2차 항체를 이용하는 ELISA kit(Pierce, Rockford, NY, USA)를 이용하였다. 생산 된 항체의 subisotype를 결정하기 위한 항혈청은 500배 희석된 것을 사용하였다.

8. Lymphocyte에 대한 OVA 자극 및 Cytokine 측정 자극 실험

면역마우스 혹은 정상마우스로부터 비장을 취하여 세포의 농도가 3×10^6 /well이 되도록 조정 후, 24-well culture plate에 분주하였다. 비장세포가 분주된 각 well에 항원 최종 농도 10 μ g/ml의 OVA를 첨가하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 72시간 배양시켰다. 배양완료 후, 배양상등액에 존재하는 OVA 특이적인 cytokine의 양을 각 cytokine에 대한 ELISA kit (Pharmingen, San Jose, CA, USA)을 이용하여 조사하였다.

9. 통계처리

대조군에 대한 실험군 간의 통계적 유의성은 Microsoft Excel

프로그램의 Student's two-tailed *t*-test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 민들레 뿌리 추출물의 총 단백질 및 중성당 함량

준비된 두 가지 시료의 기본적인 구성 조성물을 측정하기 위하여 Bio-Rad 사의 단백질 분석 Kit를 이용하여 100°C 및 4°C 의 총 단백질 함량을 조사하였다(Table 1). 표준물질로서 BSA에 대한 표준곡선을 작성 후, 두 시료의 단백질 함량을 측정된 결과, 4°C 추출물 100 mg/ml에는 65 μ g/ml의 단백질이, 100°C 추출물에는 5 μ g/ml 이하의 단백질을 함유하였고, glucose를 표준물질로 phenol-sulfuric acid method에 의하여 총 중성당 함량을 조사한 결과 100 mg/ml의 4°C 및 100°C 의 물로 추출한 민들레 뿌리에는 각각 6,658 μ g/ml 및 15,590 μ g/ml의 중성당을 함유하는 결과를 보이므로 주로 다당체 성분이 민들레 뿌리 추출물을 구성하는 주성분이 결과를 보였다.

2. 민들레 추출물의 세포 독성 효과

민들레 추출물의 대식세포에 대한 세포 독성 효과를 *in vitro*에서 조사하였다(Fig. 1). 민들레 뿌리 4°C 추출물은 8 mg/ml 이하에서, 100°C 추출물은 18 mg/ml 이하의 농도에서 대식 세포에 영향을 주지 않았다. 대식세포의 증식을 50% 억제하는 농도인 IC_{50} 값을 측정된 결과, 뿌리 4°C 추출물의 경우 45 mg/ml, 100°C 추출물의 경우 130 mg/ml인 결과를 보이므로 민들레 뿌리 추출물의 경우 정상세포에 대한 세포 독성 효과는 매우 약한 결과를 보였다. 민들레 각 뿌리 추출물의 IC_{50} 값을 총 중성당 농도로 환산하면 4°C 추출물의 경우 약 3 mg/ml, 100°C 추출물의 경우 약 20 mg/ml인 결과를 보이므로 민들레 뿌리 추출물에 함유된 다당류는 대식세포에 세포 독성 효과를 나타내지 않는 성분으로 생각되었다. 그러나 정상세포에 대한 민들레 뿌리 추출물의 IC_{50} 값을 단백질 농도로 환산하면 4°C 추출물의 경우 약 29.3 μ g/ml를 보였다. 4°C 추출물에

Table 1. Approximate contents of total proteins and carbohydrate of water extracts from roots of *Taraxacum officinale*

Group	<i>Taraxacum officinale</i> (100 mg/ml)	
	Total protein(μ g/ml)	Neutral sugar(μ g/ml)
4°C extracts	65	6,658
100°C extracts	-	15,590

Protein concentration was determined using the Bio-Rad assay kit with bovine serum albumin(BSA) as a standard. The total neutral sugar content was measured colorimetrically by the phenolsulfuric acid method using glucose as a standard.

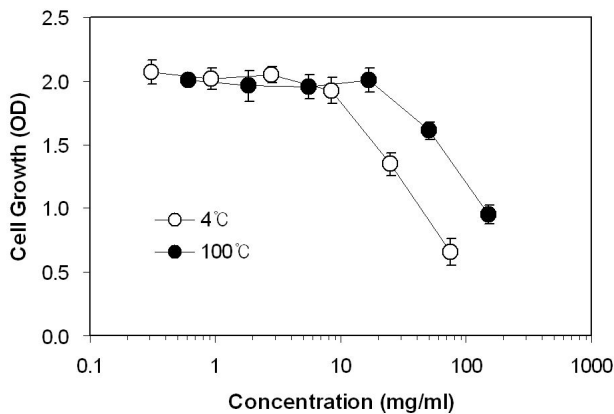


Fig. 1. Effect of water extracts from roots of *Taraxacum officinale* on the growth of macrophages. Macrophage (1×10^5 /well) were co-incubated with the indicated dose of 4°C and 100°C *Taraxacum officinale* root extract for 48 hr. The proliferation of these cells was measured by a WST-1-based colorimetric assay.

서 대식세포에 대한 IC_{50} 값이 $29.3 \mu\text{g/ml}$ 인 결과는 뿌리 성분에 최소한 세포 독성을 가지는 단백질 성분이 존재한다는 것을 암시하는 결과로 생각된다. 현재까지 민들레 성분 및 활성에 대한 연구는 주로 폴리페놀화합물 및 유기용매 층의 항산화, 항염증에 대한 연구가 주를 이루어 왔고^{18,19}, 다당류 및 단백질 성분 분석에 관한 발표는 거의 없었다. 최근 민들레 추출물에 의한 항암 활성에 관한 보고가 있었으나, 그 유효 성분에 대한 언급은 없었다²⁰. 앞으로의 민들레 다당류 및 단백질 성분에 대한 관심을 가지는 추세에 있는 것으로 생각된다. 따라서 현재 연구되는 물 추출물에서의 면역 조절, 항암 및 항염증, 항알러지 활성과 관련하여 비교적 고분자 성분인 단백질

성분의 의한 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

3. 민들레 뿌리 추출물의 대식세포 활성 유도 작용

활성화된 대식세포는 스스로 여러 가지 cytokine을 생산함으로써 이후의 면역 반응을 유도한다는 것은 잘 알려진 사실이다²¹. 본 실험은 민들레 뿌리 4°C 및 100°C 추출물을 대식세포를 직접 자극하여 활성화시키는 효과가 있는지를 확인하기 위하여 실시하였으며, 그 지표로서 시료로 자극된 대식세포의 배양 상등액에 생산된 IL-12, TNF- α 및 IL-6의 양을 조사하였다. 그 결과, Fig. 2에 제시한 바와 같이 민들레 뿌리 4°C 및 100°C 추출물 모두 대식세포로부터 면역 반응을 조절하는 여러가지 cytokine을 생산하는 활성이 있었다. 두 추출물의 자극에 의한 IL-12의 생산은 0.1 mg/ml부터 활성을 보이기 시작하여 1~5 mg/ml의 농도에서 최고의 활성을 보였다. 대식세포 혹은 수지상세포가 생산하는 IL-12는 자연살해세포(NK-cell) 및 Th1 세포에 작용하여 IFN- γ 의 생산을 유도하게 됨으로서 세포성 면역의 유도에서 선천적인 NK 세포 및 T 세포를 항원에 대항케 하는 effector form으로 분화하게 하는 작용이 있으므로 주로 Th1 성향의 세포성 면역계를 활성화시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있다^{22,23}. 따라서 대식세포로부터 IL-12의 생산능은 항원에 대항하는 자연 및 획득 면역계의 활성화에 중요한 요소로 작용되는 cytokine으로 간주되고 있다²³. 따라서 민들레 뿌리 추출물은 항원 제시 세포의 성숙과 이후 항원 특이적인 면역 증강 효과에서 항원 제시 세포의 항원에 대한 항원 제시능을 높이는 작용이 있음을 제시하였다고 생각되며, 이러한 경향은 TNF- α 의 유도 양식에서도 매우 약한 생산능을 보였으나 동일한 경향을 보였다. 즉, TNF- α 는 미성숙 DC의 표면에 MHC 혹은 보조자극인자(co-stimulatory molecule)의 발현을 촉진하므로 성숙된 형태의

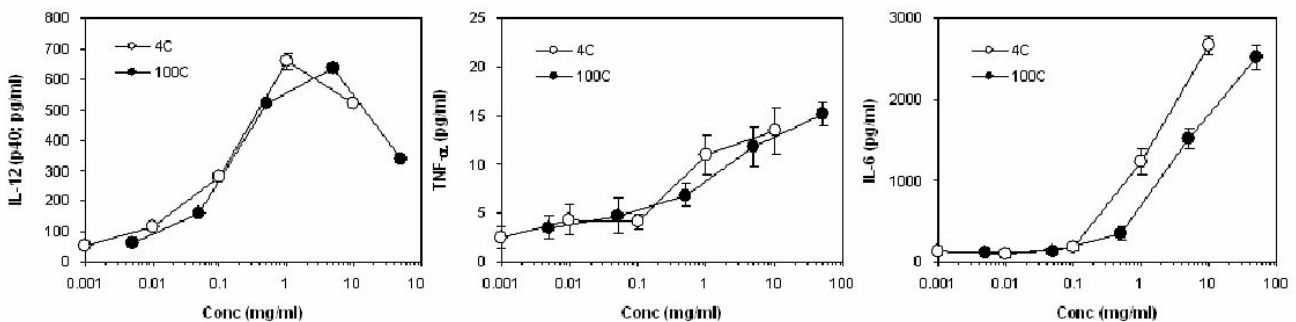


Fig. 2. Effects of *Taraxacum officinale* root extract on the production of cytokines by peritoneal exudate macrophages (PEMs). Peritoneal macrophages were harvested from 3% thioglycollate-treated mice. The PEMs suspended in culture medium were plated into 24-well culture plates. The PEMs were co-incubated with the indicated dose of 4°C and 100°C root extract for 24 hr. The concentration of each cytokine in the cultured supernatant was determined by ELISA method. The concentration IL-12, TNF- α and IL-10 by stimulation of LPS ($0.5 \mu\text{g/ml}$) is 2451 ± 108 , 86.6 ± 9.6 and $2885 \pm 136 \text{ pg/ml}$, respectively.

DC로 전환시키는 작용이 있다²⁴⁾. 결국, 민들레 뿌리 추출물은 복강세포의 TNF- α 의 생산성을 증진시킴으로써 미성숙 DC를 성숙시키게 되고, 따라서 항원에 대한 항원 제시능을 획득한 성숙 DC는 IL-12를 생산함으로써 항원 특이적인 T 세포의 활성화가 유도되는 것으로 생각되었다^{22~24)}. 결론적으로, 민들레 뿌리 추출물은 외래 항원이 침입할 경우 항원 제시 세포의 항원 제시능을 획득하기 위한 성숙된 형태로의 전환을 자극하는 cytokine 유도능에 의해 면역 반응의 개시 단계를 자극하는 활성이 있는 것으로 사료되었기에^{22~24)}, 항원 OVA와 동시 면역할 경우 항원에 대한 면역 증강 활성을 유도할 수 있는지 실험을 진행하였다. 한편, 염증성 cytokine의 하나로 선천 면역 및 획득 면역의 활성화에 기여²⁵⁾하는 IL-6의 생산능을 조사한 결과 민들레 뿌리 추출물은 농도 의존적으로 매우 높은 IL-6의 생산능을 보였다. 이들 염증성 cytokine은 면역 반응이 개시되는 장소에서 염증 반응을 유도하는 주요 성분임과 동시에 T-세포에 항원의 제시 단계에서 T-세포를 활성화시키는 중요한 요인이다^{22~25)}. 본 결과에서 민들레 뿌리 추출물의 대식세포를 스스로 자극함으로써 면역 반응이 일어나는 초기에 생체 방어에 유리한 작용을 한다는 것을 확인하였다. 따라서, 대식세포를 자극하는 활성을 지닌 민들레 뿌리 성분이 항원과 함께 면역할 경우 획득 면역에 미치는 효과를 검토하였다.

4. 단백질 항원 OVA에 대한 체액성 면역 반응의 증진 효과

본 실험에 사용된 항원인 OVA는 많은 실험동물 모델을 이용한 실험에서 T-helper type 2(Th2) 성향이 우월한 면역 반응을 일으키는 항원으로 알려져 있다²⁷⁾. Th2 성향의 면역 반응은 IL-4, IL-10 및 IL-13의 생산을 높임과 동시에 혈액의 IgG1 및 IgE의 생산을 높이는 특성을 가지는 면역 반응이다^{26,27)}. 반면에 IL-2 및 IFN- γ 를 중심으로 하는 Th1 성향의 면역 반응은 IgG2 type의 항체를 생산하게 하므로써 Th1과 Th2 면역 반응은 서로 길항작용을 하는 것으로 알려져 있다^{26,27)}. 따라서 본 실험은 OVA를 항원으로 이용하고 민들레 뿌리를 동시에 면역하였을 경우 면역 반응의 변화를 항원에 대하여 생산된 항체의 subclass을 조사하였다. 실험에 적용한 민들레 뿌리 추출물은 독성 실험 결과 더 낮은 세포 독성 활성을 가지는 10 $^{\circ}$ C 추출물을 사용하였다. 실험 결과, Fig. 3에서 제시한 바와 같이 OVA의 면역에 의한 반응에서 민들레 뿌리 추출물을 혼합하여 면역한 결과, IgG1, IgG2a/b 및 IgE의 항체 생산에는 유의한 영향을 미치지 못하였다. 따라서 항체 생산에서 민들레 뿌리의 동시 면역이 면역 반응에 미치는 효과를 좀 더 자세히 검토하게 위하여 시판되는 adjuvant의 하나인 Freund's incomplete adjuvant(FIA)와 동시에 면역하는 방법을 사용하였다. FIA는 paraffin oil 성분으로 항원과 유화(emulsion)하여 면역할 경우, 생체에서 항원의 저장작용에 의하여 높은 adjuvant

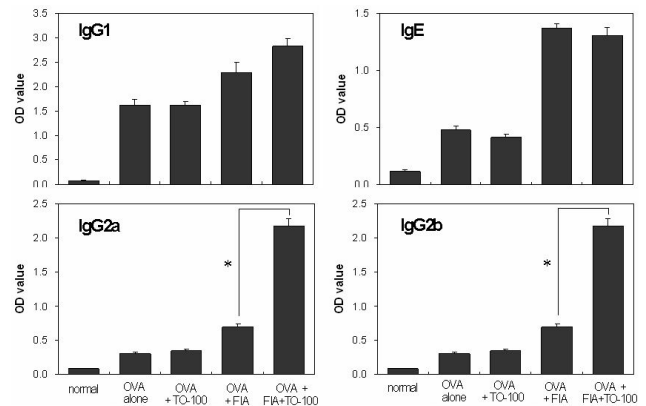


Fig. 3. Determination of subclasses of OVA-specific antibodies in serum specimens. Three BALB/c mice per group were immunized sc with the indicated conditions as Material and Method. Isotypes of OVA-specific antibodies were determined by ELISA using 500-fold diluted serum specimens obtained 5 days after the final immunization. $p^* < 0.001$, compared with the control group(OVA+FIA) by Student's two-tailed *t*-test.

활성을 나타내는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 민들레 뿌리를 항원과 함께 FIA에 유화시켜 면역한 결과, IgG1 및 IgE type의 항체 생산능은 큰 변화를 보이지 않은 반면 IgG2a 및 IgG2b 항체의 경우 OVA를 FIA로 유화시킨 군에 비하여 민들레 뿌리 추출물이 함유될 경우 높은 항체 생산능을 보였다(Fig. 3). 일반적으로 IgG1 및 IgE type의 항체 생산은 Th2 세포의 활성화에 의하여 생산되고, IgG2a 및 IgG2b type의 항체 생산은 주로 Th1 type 세포에 활성화에 의하여 생산되는 것을 알려져 있다^{3,6,27,29)}. 이러한 각 항체의 생산은 Th1 및 Th2 세포가 생산하는 Th1 및 Th2 type의 cytokine 생산 양식으로 설명할 수 있기에 각 면역 마우스의 비장세포를 항원 OVA를 자극 후에 생산되는 cytokine의 생산 양식에 대한 실험을 실시하였다.

5. Th1 및 Th2-type Cytokine 측정

OVA 특이적인 항체의 생산에서 adjuvant로서 민들레 뿌리 추출물이 T 세포에 미치는 영향을 T 세포 배양 상등액에 생산된 항원 특이적인 Th1-type 및 Th2-type cytokine의 양을 측정함으로써 조사하였다. 즉, 각 군의 마우스로부터 비장세포를 분리하고 항원으로 사용한 OVA에 동시 배양 후에 배양 상등액에 생산된 각 cytokine의 양을 측정하였다. Fig. 4에 제시한 바와 같이 항원 OVA와 민들레 뿌리 추출물을 혼합하여 면역한 마우스는 항원 단독면역군의 마우스에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 adjuvant로서 민들레 뿌리 추출물을 FIA에 혼합한 후 사용한 경우는 FIA에 항원을 유화시켜 면역한 대조군에 비하여 Th1-type 성향인 IFN- γ 의 생산이 약

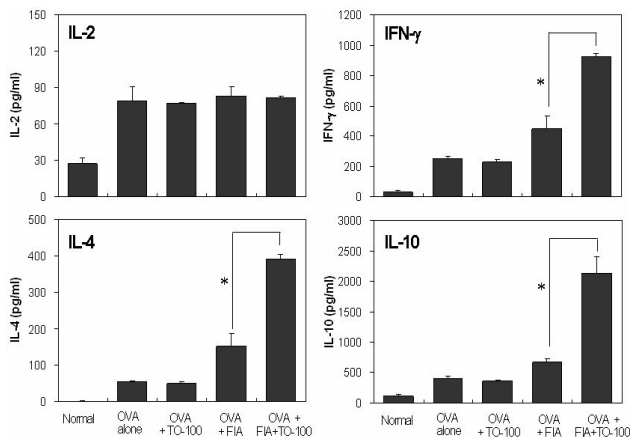


Fig. 4. Cytokine assay for OVA-specific cytokines. Three BALB/c mice per group were immunized sc with the indicated conditions in Fig. 3. Five days after the final immunization, splenocytes were harvested from the immunized mice and co-incubated with OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 3 days. The level of OVA-specific cytokines in the culture supernatants was measured using ELISA kits. $p^* < 0.001$, compared with the control group (OVA+FIA) by Student's two-tailed t -test.

2배 정도 증진된 결과를 보였고, Th2-type인 IL-4 및 IL-10 등의 cytokine 생산성도 각각 2.6배 및 3.1배 증진되는 경향을 보이므로 민들레 뿌리 추출물은 항원을 FIA에 유화시켜 면역할 경우, Th1 및 Th2 관련 cytokine 모두 증진시키는 활성이 있는 결과를 보였다. 체액성 면역에 관여하는 effector B 세포의 기능은 Th1 세포가 생산하는 Th1 성향을 가지는 IL-2, IFN- γ , GM-CSF 등의 cytokine 혹은 Th2-type의 helper T 세포가 생산하는 IL-4, IL-6 및 IL-10에 의하여 조절된다^{23,29,30}. Th1-type cytokine은 B 세포가 IgG2 type의 항체를 생산하는데 관여하며, Th2-type cytokine은 주로 IgG1 및 IgE type의 항체를 생산하는 B 세포로의 분화를 촉진하는 것으로 보고되고 있다^{29~31}. 본 실험 결과, 민들레 뿌리 추출물은 Th1 성향 및 Th2 관련 cytokine의 생산을 모두 증진시키므로, Th1 성향 cytokine 의존적인 IgG2a/b type의 항체 생산 및 Th2 성향 cytokine 의존적인 IgG1 type의 항체 생산을 증진시켰다. 항체 IgG1 및 IgG2 type의 항체는 모두 항원의 옅소닌화, 보체와 결합하여 항원을 제거하는 특성을 지니므로 생체 방어에 유용한 역할을 하는 항체들이다³². 그러나 대표적인 Th2 type cytokine의 증가에도 불구하고 알러지를 유발하는 IgE의 항체²⁷ 생산은 증진시키지 않는 결과를 보였다. 따라서 민들레 뿌리 추출물이 특히 Th1/2 성향의 면역 반응을 모두 자극하는 활성이 있음에도 불구하고 최종적으로 IgE에 대한 면역 반응을 증진시키지 않는 결과를 보였다. 따라서 민들레 뿌리 추출물을 구성하는 성분 중 일부는 항원 특히 알러젠(allergen)의 특성을 가

지는 단백질 항원인 OVA에 대한 면역 반응의 변화를 나타낼 수 있는 활성을 가지고 있음을 강하게 암시하였다. 앞으로 민들레 뿌리 성분을 위생가설에 대하여 항원 특히 알러젠에 대한 면역 반응인 Th2형의 반응을 감소시키기 위하여 활성을 가지는 성분의 분리 정제가 필요할 것으로 생각되었다.

요약 및 결론

민들레 뿌리 추출물의 세포 독성 및 대식세포에 대한 cytokine의 유도능 및 단백질 항원 OVA에 대한 면역 반응에 미치는 효과를 조사하였다. 민들레 뿌리 추출물은 thioglycollate에 의하여 유도된 macrophages를 자극하여 IL-6 및 IL-12와 같은 cytokine의 생산을 증진시켰다. 이러한 결과는 민들레 뿌리 추출물이 선천 면역 반응을 자극함으로써 이후 항원 특이적인 T 세포의 활성화를 유도하는 활성이 있음을 보여주었다. 항원 OVA에 민들레 뿌리 추출물을 혼합 후 FIA에 유화하여 면역한 결과, 항원에 대한 항체 생산에서 IgG1, IgG2a 및 IgG2b type 항체 생산은 높이는 결과를 보였으나, IgE의 생산에는 영향을 미치지 않는 결과를 보였다. 각 면역 마우스의 비장세포를 항원 OVA로 자극 후 배양 상등액에 생산된 cytokine을 조사한 결과, 항원 특이적인 Th1(IFN- γ) 및 Th2-type의 cytokine (IL-4, IL-6와 IL-10)이 증가된 결과를 얻었다. 이 결과는 민들레 뿌리 추출물은 알러젠 등의 항원에 대한 면역 반응을 변환시킬 수 있는 성분을 함유하고 있음을 강하게 제시하였다.

참고문헌

1. Azuma, I. Synthetic immunoadjuvants: application to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 10:1000-1006. 1992
2. Sfondrini, L, Balsari, A and Ménard, S. Innate immunity in breast carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer*. 10:301-308. 2003
3. Arancibia, SA, Beltrán, CJ, Aguirre, IM, Silva, P, Peralta, AL, Malinarich, F and Hermoso, MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol. Res*. 40:97-112. 2007
4. Booth, JS, Nichani, AK, Benjamin, P, Dar A, Krieg, AM, Babiuk, LA and Mutwiri, GK. Innate immune responses induced by classes of CpG oligodeoxynucleotides in ovine lymph node and blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 115:24-34. 2007
5. van Helden, SF, van Leeuwen, FN and Figdor, CG. Human and murine model cell lines for dendritic cell biology

- evaluated. *Immunol. Lett.* 117:191-197. 2008
6. León, B and Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol. Cell Biol.* 86:320-324. 2008
 7. Koloski, NA, Bret, L and Radford-Smith, G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J. Gastroenterol.* 14:165-173. 2008
 8. Feeney, MA, Murphy, F, Clegg, AJ, Trebble, TM, Sharer, NM and Snook, JA. A case-control study of childhood environmental risk factors for the development of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14:529-534. 2002
 9. Isolauri, E, Huurre, A, Salminen, S and Impivaara, O. The allergy epidemic extends beyond the past few decades. *Clin. Exp. Allergy.* 34:1007-1010. 2004
 10. Chinen, J and Shearer, WT. Advances in basic and clinical immunology in 2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122:36-41. 2008
 11. Brandtzaeg, PE. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann. NY Acad. Sci.* 964:13-45. 2002
 12. Park, JY, Park, CM, Kim, JJ and Song, YS. Hepatoprotective activity of Dandelion (*Taraxacum officinale*) water extract against D-galactosamine-induced Hepatitis in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 37:177-183. 2008
 13. Cho, SY, Oh, YJ, Park, JY, Lee, MK and Kim, MJ. Effect of Dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 32:458-463. 2003
 14. Koo, HN, Hong, SH, Song, BK, Kim, CH, Yoo, YH and Kim, HM. *Taraxacum officinale* induces cytotoxicity through TNF-alpha and IL-1alpha secretion in Hep G2 cells. *Life Sci.* 74:1149-1157. 2004
 15. Sigstedt, SC, Hooten, CJ, Callewaert, MC, Jenkins, AR, Romero, AE, Pullin, MJ, Kormienko, A, Lowrey, TK, Slambrouck, SV and Steelant, WF. Evaluation of aqueous extracts of *Taraxacum officinale* on growth and invasion of breast and prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* 32:1085-1090. 2008
 16. Jeon, HJ, Kang, HJ, Jung, HJ, Kang, YS, Lim, CJ, Kim, YM and Park, EH. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *J. Ethnopharmacol.* 115:82-88. 2008
 17. Dubois, M, Gilles, KA, Hamilton, JK, Rebers, PA and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28:350-356. 1956
 18. Hudec, J, Burdová, M, Kobida, L, Komora, L, Macho, V, Kogan, G, Turianica, I, Kochanová, R, Lozek, O, Habán, M and Chlebo, P. Antioxidant capacity changes and phenolic profile of *Echinacea purpurea*, nettle(*Urtica dioica* L.), and dandelion (*Taraxacum officinale*) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators. *J. Agric. Food Chem.* 55:5689-5696. 2007
 19. Jeon, HJ, Kang, HJ, Jung, HJ, Kang, YS, Lim, CJ, Kim, YM and Park, EH. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *J. Ethnopharmacol.* 115:82-88. 2008
 20. Sigstedt, SC, Hooten, CJ, Callewaert, MC, Jenkins, AR, Romero, AE, Pullin, MJ, Kormienko, A, Lowrey, TK, Slambrouck SV and Steelant, WF. Evaluation of aqueous extracts of *Taraxacum officinale* on growth and invasion of breast and prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* 32:1085-1090. 2008
 21. Saiki, I, Saito, S, Fujita, C, Ishida, H, Iida, J, Murata, J, Hasegawa, A and Azuma, I. Induction of tumoricidal macrophages and production of cytokines by synthetic muramyl dipeptide analogues. *Vaccine.* 6:238-244. 1988
 22. Macatonia, SE, Hosken, NA, Litton, M, Vieira, P, Hsieh, CS, Culpepper, JA, Wysocka, M, Trinchieri, G, Murphy, KM and O'Garra, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 154:5071-5079. 1995
 23. Dredge, K, Marriott, JB, Todryk, SM and Dalglish, AG. Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 51:521-531. 2002
 24. Kikuchi, K, Yanagawa, Y, Aranami, T, Iwabuchi, C, Iwabuchi, K and Onoe, K. Tumour necrosis factor-alpha but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. *Immunology.* 108:42-49. 2003
 25. Jones, SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 175:3463-3468. 2005
 26. Kenny, TP, Keen, CL, Schmitz, HH and Gershwin, ME. Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Biol. Med.* 232:293-300. 2007
 27. Dearman, RJ, Skinner, RA, Herouet, C, Labay, K, Debruyne, E and Kimber, I. Induction of IgE antibody responses by protein allergens: inter-laboratory comparisons. *Food Chem. Toxicol.* 4:1509-1516. 2003
 28. Bennett, B, Check, IJ, Olsen, MR and Hunter, RL. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J. Immunol. Methods.* 153:31-40. 1992

29. Zhu, FG, Kandimalla, ER, Yu, D, Tang, JX and Agrawal, S. Modulation of ovalbumin-induced Th2 responses by second-generation immunomodulatory oligonucleotides in mice. *Int. Immunopharmacol.* 4:851-862. 2004
30. Dredge, K, Marriott, JB, Todryk, SM and Dalgleish, AG. Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 51: 521-531. 2002
31. Yoon, TJ, Yoo, YC, Kang, TB, Her, E, Kim, SH, Kim, K, Azuma, I and Kim, JB. Cellular and humoral adjuvant activity of lectin isolated from Korean mistletoe (*Viscum album colaratum*) *Int. Immunopharmacol.* 1:881-889. 2001
32. Verbrugh, HA, Peterson, PK, Nguyen, BY, Sisson, SP and Kim, Y. Opsonization of encapsulated *Staphylococcus aureus*: the role of specific antibody and complement. *J. Immunol.* 129:1681-1687. 1982
-
- (2008년 7월 20일 접수; 2008년 9월 20일 채택)