

## 프로폴리스 및 발효 프로폴리스의 섭취가 BALB/c mice의 면역활성에 미치는 영향

김윤희 · 권혁세 · 김대환 · 박일환<sup>1</sup> · 박상재<sup>1</sup> · 신현경<sup>2</sup> · 김진경\*

한림대학교 식의약품의 효능평가 및 기능성 소재 개발센터, <sup>1</sup>한국양봉프로폴리스, <sup>2</sup>한림대학교 식품영양학과

### Immunomodulatory Effects of Propolis and Fermented-propolis in BALB/c Mice

Yoon Hee Kim, Hyuck-Se Kwon, Dae Hwan Kim, IL-Hwan Park<sup>1</sup>, Sang-Jae Park<sup>1</sup>,  
Hyun-Kyung Shin<sup>2</sup>, and Jin-Kyung Kim\*

Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University

<sup>1</sup>Korea Agricultural Propolis Inc.

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

**Abstract** Propolis is the generic term for the resinous substance collected by honey bees from a variety of plant sources. In this study, we have assessed the immunomodulatory properties of propolis (P) and fermented-propolis (FP) in BALB/c mice. Mice were subjected to gavage once a day (for 14 days) with 50, 100, 200 mg/kg body weight P, FP, or vehicle. Lymphocytes were isolated from the spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) and the immune cell proportions, proliferative activities, and cytokine production were evaluated. The P- and FP-administration induced similar, but differential, alterations in the percentage of immune cell populations and their biological functions, including cytokine production and NK cell cytotoxicity. The proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen was increased slightly in the P- and FP-administered mice as compared to the vehicle-treated mice. In MLN, the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells was increased significantly in the 200 mg/kg P-treated mice. The mice which were treated with P and FP evidenced significantly increased interferon- $\gamma$  and interleukin-4 production in concanavalin A-stimulated splenocytes, whereas the production of these cytokines was not shown to be induced by P-treatment. In addition, NK cell activity was also increased dramatically by the administration of P and FP. Collectively, these findings showed that P and FP are wide-spectrum immunomodulators, which may modulate both innate and adaptive immune responses.

**Key words:** propolis, immunomodulatory effect, cytokines, NK cell activity

## 서 론

20세기 들어 급속한 의학의 발전과 경제성장의 영향으로 인간의 평균 수명이 증가하고 있는 반면, 식생활의 서구화, 운동량의 감소, 음주, 흡연을 포함한 각종 사회적 스트레스의 증가로 암 및 노인성 만성 질환은 점차 증가하고 있다. 더욱이 오염된 대기환경 및 화학물질에의 노출 증가로 아토피성 피부염 및 만성장염 등과 같은 면역 관련 질환자수도 크게 증가하고 있는 실정이다(1).

최근 천연 식물자원 중에 함유된 생리활성 성분들에 대한 관심이 높아지면서, 이들 생리활성 성분을 대상으로 면역체계의 활성을 유도하여 면역력을 증가시키고, 부작용이 적은 면역조절제 개발에 대한 연구가 진행되고 있다(2). 이들 천연물 유래의 면역조

절제는 대식세포, natural killer(NK) 세포 및 T 림프구의 활성을 증가시킬 뿐만 아니라 이들 세포로부터 분비되어 생리활성을 조절하는 interleukin(IL)-2 및 interferon(IFN)- $\gamma$  등과 같은 사이토카인(cytokine) 분비를 촉진시켜, 면역체계의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(3-5).

프로폴리스는 꿀벌이 유해한 세균이나 바이러스로부터 벌집을 보호하기 위해서 수목에서 모은 수액에 타액을 혼합시켜 만든 수지성, 점착성, 고무상의 물질로 beeswax, resin, flavonoids, organic acids, caffeic acid 등의 다양한 성분을 함유하고 있다. 프로폴리스는 기원전 300년경부터 유럽이나 브라질 등에서 민간요법의 약제로서 널리 이용되어 왔다. 일례로 기원전 1세기경에 Plink의 저서 'Historia naturalis'에서는 프로폴리스가 신경통, 격감, 부종억제, 농양 치료제 등으로 사용하여 왔다고 보고하고 있다(6,7). 이처럼 고대로부터 생리활성 물질로 사용되어 오던 프로폴리스는 최근 다양한 연구에 의해 항암(8-10), 항균(11), 항박테리아(12), 항바이러스(13), 항염증(14,15) 및 항산화(16) 등의 활성을 보이는 것으로 밝혀졌다.

면역조절작용에 있어서 프로폴리스의 효능에 대한 연구는 매우 미비하며, 프로폴리스에 효모를 접종하여 발효시킨 물질에 대한 면역조절능에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구

\*Corresponding author: Jin-Kyung Kim, Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do 200-702, Korea  
Tel: 82-33-248-3106  
Fax: 82-33-248-3103  
E-mail: kimjin@hallym.ac.kr  
Received July 5, 2008; revised August 15, 2008;  
accepted August 20, 2008

에서는 프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물을 실험동물에게 경구 투여함으로써 이들 추출물이 면역활성능에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험물질 제조

실험에 사용한 프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물은 한국양봉프로폴리스(주)로부터 제공받아 사용하였다. 프로폴리스 추출물(P)은 브라질산 원재 100 g에 주정 500 mL을 가하여 60°C에서 3시간 동안 추출, 여과, 농축하여, 4°C에서 밀납을 침전시켰다. 이 침전물을 제거한 후 얻어진 추출액을 진공 농축하여 프로폴리스 추출물 18 g을 얻었다. 발효 프로폴리스 추출물(FP)은 브라질산 원재 100 g에 주정 500 mL을 가하여 60°C에서 3시간 동안 추출, 여과한 후 추출액을 100 mL로 농축하였다. 이 농축액에 미세결정성 셀룰로오스를 45 g 가한 후 진공 농축하여 얻은 프로폴리스 추출물 분말 50 g에 10%(w/v) 포도당 500 mL을 가하였다. 여기에 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하여 37°C에서 2일간 발효시켜 동일 부피의 주정을 가하고 60°C에서 2시간 동안 추출, 여과한 후 진공, 농축하였다. 발효 프로폴리스 추출물은 원재 100 g 대비 13 g이었다. 본 실험에서 사용한 프로폴리스 및 발효 프로폴리스의 순도는 100%였다.

### 실험동물과 시험물질의 투여

실험동물은 5주령의 암컷 BALB/c 마우스를 코아텍(주)(Pyongyang-tack, Korea)로부터 공급받아 한림대학교 실험동물실에서 7일간 사육, 순화시킨 후, 사용하였다. 사육실의 온도는 20.9-22.6°C, 상대습도 50-55%, 조명주기 12시간(08:00-20:00)으로 조절하였고, 물과 식이는 자유 급여시켰다. 7일간 순화기간을 걸친 마우스를 7개의 실험군으로 분리하여, 각 실험군은 8마리의 마우스로 구성하였다. 95% 주정으로 재 용해한 프로폴리스 추출물과 발효 프로폴리스 추출물을 체중 1 kg 당, 각각 50, 100 그리고 200 mg/kg body weight(B.W.)의 농도로 3차 증류수를 이용하여 희석한 뒤, 14일 동안 연속적으로 경구투여하였다. 본 실험에서 투여한 프로폴리스 추출물과 발효 프로폴리스 추출물의 ethanol 농도는 5%로 조정하였고, 대조군은 5% ethanol을 경구투여하였다.

### 비장(spleen) 및 창자간막 림프절(mesenteric lymph node)로부터 림프구의 분리

실험동물을 경추탈골하여 비장 및 창자간막 림프절을 무균적으로 적출하고, 각 림프절을 RPMI 1640 medium(Hyclone, Logan, UT, USA) 내에서 40 µm stainless steel mesh(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)로 분쇄하여 단일세포를 작성하였다. 분쇄된 단일세포용액에 RPMI 1640 medium을 첨가하여 4°C, 1,200 rpm에서 5분간 원심침전 후, RBC lysis buffer(eBioscience, San Diego, CA, USA)로 적혈구를 제거하여 림프구를 얻었다. 이 림프구에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin이 함유된 complete RPMI 1640 medium을 첨가하여 부유시킨 후, Guava Viacount Kit(Guava Technologies, Hayward, CA, USA)을 이용하여 세포수를 측정하였다.

### 림프구의 증식능 측정

비장 및 창자간막 림프구의 증식능은 CellTiter 96® AQueous ONE Solution Assay Kit(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다(17). 비장 및 창자간막 림프절에서 분리한 림프구를

$1 \times 10^5$  cells/200 µL/well로 96 well plate에 분주하여 비장림프구는 concanavalin A(ConA, 5 µg/mL)를 첨가하였고, 창자간막 림프구는 anti-CD3ε(1 µg/mL)와 anti-CD28(1 µg/mL) 단클론항체를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 각 well에 cell titer 용액을 20 µL씩 첨가하여 2시간 동안 추가배양 후, SpectraMaxM2 Microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 OD 값을 측정하여 림프구의 증식능을 측정하였다.

### 림프구의 아집단 비율 측정

비장 및 창자간막 림프구의 아집단을 fluorescence-activated cell sorting(FACS)를 이용하여 측정하였다(18). 비장 및 창자간막 림프구를  $1 \times 10^4$  cells/200 µL/well 농도로 96 well round bottom plate에 분주하여 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated hamster anti-mouse CD3, phycoerythrin(PE)-conjugated rat anti-mouse B220, PE-conjugated rat anti-mouse CD4, PE-conjugated rat anti-mouse CD8, FITC-conjugated rat anti-mouse pan NK 단클론항체를 첨가하였다. 각 단클론항체 첨가 30분 후, flow cytometer(Guava Technologies)를 이용하여 세포의 아집단 비율을 측정하였다.

### 림프구의 사이토카인 분비능 측정

비장 및 창자간막 림프구의 사이토카인 분비능은 Park 등의 방법을 수정, 보완 후 측정하였다(17). 비장 및 창자간막 림프구를 24 well plate에  $8 \times 10^5$  cells/500 µL/well로 분주하였다. 비장림프구는 ConA(5 µg/mL)로, 창자간막 림프구는 anti-CD3ε(1 mg/mL)과 anti-CD28(1 mg/mL) 단클론항체로 각각 48시간 동안 자극시켜 세포배양 상층액을 얻었다. 세포배양 상층액 중의 IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ의 양은 ELISA Kit(eBIOSCIENCE)을 이용하여 측정하였다.

### Natural killer(NK) 세포 활성 측정

NK 세포 활성은 Combe 등의 방법을 수정, 보완하여 측정하였다(19). 비장 림프구중의 NK 세포는 pan NK selection kit(Stem Cell Technologies, Vancouver, CA, USA)을 이용하여 분리하였다. 분리한 NK 세포를 RPMI 1640 medium에 현탁시켜 작동세포(effector cell)로 사용하였다. 표적세포로는 YAC-1 세포를 이용하였다. NK 세포와 YAC-1 세포를 20:1의 비율로 96 well round bottom plate에 분주하여, 37°C에서 4시간 동안 배양하여, NK 세포 활성을 Guava® EasyCyte™ CellToxicity Kit(Guava Technologies)을 이용하여 측정하였다.

### 통계학적 분석

모든 자료는 mean±SEM으로 나타내었으며, 유의성 검사는 GraphPad Prism 4.0 software(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였고, 각 시료간의 통계적 유의성은 Bonferroni multiple comparison post test로 검증하였다.  $p < 0.05$  이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### 비장과 창자간막 림프절의 면역세포 아집단 비율

프로폴리스와 발효 프로폴리스 추출물의 투여가 면역계에 미치는 영향을 검토하기 위해, 먼저 비장과 창자간막 림프절의 림프구의 아집단의 비율을 검토하였다(Tables 1, 2). 비장림프구에서는 프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물 투여군 모두에서 대조군(vehicle-투여군)과 비교하여 CD4<sup>+</sup> 와 CD8<sup>+</sup> T 림프구

**Table 1. Proportion of lymphocytes isolated from spleen in BALB/c mice treated with propolis or fermented-propolis for 14 days**

Group	Lymphocyte subsets				
	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	B220 <sup>+</sup>	panNK <sup>+</sup>
Vehicle	41.92±4.14	24.91±3.53	15.77±0.65	48.13±1.00	8.75±0.75
P-50	48.65±1.61	30.34±1.35	16.88±0.65	45.99±0.82	8.71±0.41
P-100	51.49±1.01	31.07±1.26	18.49±0.39*	44.99±0.70	8.73±0.40
P-200	49.85±0.35	30.50±0.24	18.01±0.10	44.03±1.00*	6.67±0.38**
FP-50	55.15±0.97*	33.85±0.60*	19.90±0.60**	42.26±0.82	6.33±2.45**
FP-100	50.55±1.45	31.33±0.72	17.74±0.61	45.41±0.64	7.43±0.40
FP-200	50.07±1.90	31.38±1.48	17.58±0.51	44.66±0.72	7.29±0.78*

P: Propolis treated group

FP: Fermented-propolis treated group

(\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  vs. vehicle treated group**Table 2. Proportion of lymphocytes isolated from mesenteric lymph node in BALB/c mice treated with propolis or fermented-propolis for 14 days.**

Group	Lymphocyte subsets			
	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	B220 <sup>+</sup>
Vehicle	45.02±2.53	25.37±0.89	15.62±1.97	17.93±2.42
P-50	36.47±4.96	27.95±3.10	10.94±1.90	22.00±1.22
P-100	49.03±3.14	29.11±2.54	12.09±1.43	27.63±0.25
P-200	70.24±1.91**	47.60±4.04**	20.51±2.64*	15.52±1.23
FP-50	48.13±4.32	34.99±4.37	9.77±1.82	21.83±3.05
FP-100	58.74±3.25	46.71±1.75**	12.52±4.71	26.46±1.85
FP-200	53.43±5.63	29.83±3.65	20.32±3.71*	20.53±1.90

P: Propolis treated group

FP: Fermented-propolis treated group

(\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  vs. vehicle treated group

의 비율이 증가하는 경향을 보였으며, B220<sup>+</sup> B 림프구 및 NK 세포는 프로폴리스 및 발효 프로폴리스 추출물 투여에 의해 감소하는 경향을 보였다.

창자간막 림프구에서는 대조군에 비해 고농도(200 mg/kg)의 프로폴리스 추출물과 발효 프로폴리스 추출물(50, 100, 200 mg/kg)의 투여에 의해 CD4<sup>+</sup> T 림프구 비율이 증가하는 경향을 보였고, B220<sup>+</sup> B 세포의 비율은 대조군과 각 추출물 투여군과의 차이를 관찰할 수 없었다(Table 2). 대조군, 프로폴리스 투여군, 발효 프로폴리스 투여군의 각 장기에서의 세포수의 변화는 없었다(결과 미제시).

Takagi 등은(20) 프로폴리스 추출물의 투여가 말초혈중의 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 림프구의 비율을 증가시킨다고 보고하였고, Andreia 등의 연구(18)에서도 *Trypanosoma cruzi*에 의해 감염된 마우스에게 프로폴리스 에탄올 추출물(50 mg/kg)을 14일 동안 경구투여하면 비장림프구의 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 림프구의 비율이 증가한다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 프로폴리스 추출물의 투여가 마우스의 대식세포를 활성화시켜 다양한 사이토카인을 분비하고, 분비된 사이토카인의 자극으로 인해 T 림프구의 비율이 증가하는 것으로 사료된다.

#### 비장 및 창자간막 림프구 증식능

대조군, 프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물 투여군에서 비장과 창자간막 림프절을 적출하여 림프구 증식능을 측정 한 결과, 대조군에 비해 프로폴리스 추출물과 발효 프로폴리스 추출물 투여군에서 분리한 림프구의 증식능이 유의적으로 증가하였다(Fig. 1). Sá-Nunes 등의 보고(21)에서는 저농도의 프로폴

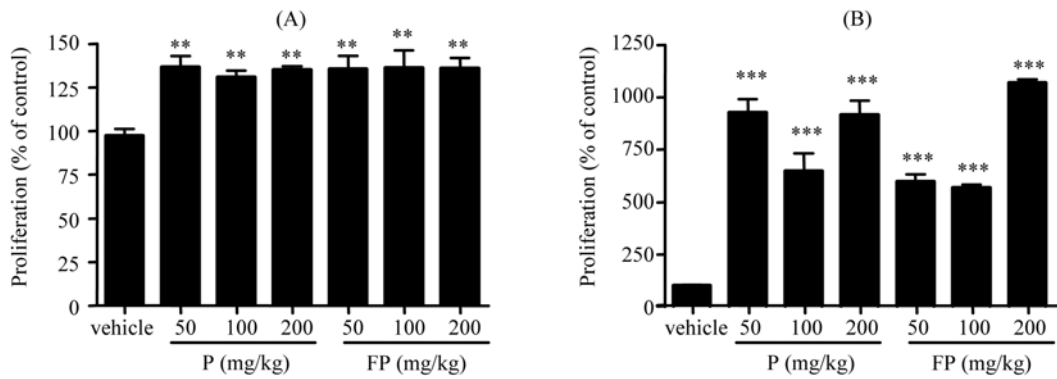
리스 에탄올추출물(2.5-10 mg/kg)을 3일간 복강 투여하여 얻은 비장림프구의 증식능이 대조군에 비해 저하되는 것을 관찰하였다. 이외는 대조적으로 프로폴리스 주요 생리활성 성분인 caffeic acid phenethyl ester(CAPE)를 20 mg/kg의 농도로 BALB/c 마우스에 14일간 경구 투여한 연구결과에서는 비장림프구의 증식능이 증가하는 것으로 나타났다(17). 이처럼, 프로폴리스 추출물 투여에 의한 비장 림프구의 증식능에 대한 연구결과가 동일하지 않은 것은 프로폴리스 추출물의 투여방법 및 투여용량에 기인한다고 사료되며, 이러한 차이에 대한 추후 연구가 필요할 것이다.

프로폴리스 추출물의 투여가 창자간막 림프구의 증식능에 미치는 영향에 관한 연구는 현재 보고된 바가 없어, 본 연구결과가 최초의 보고이다.

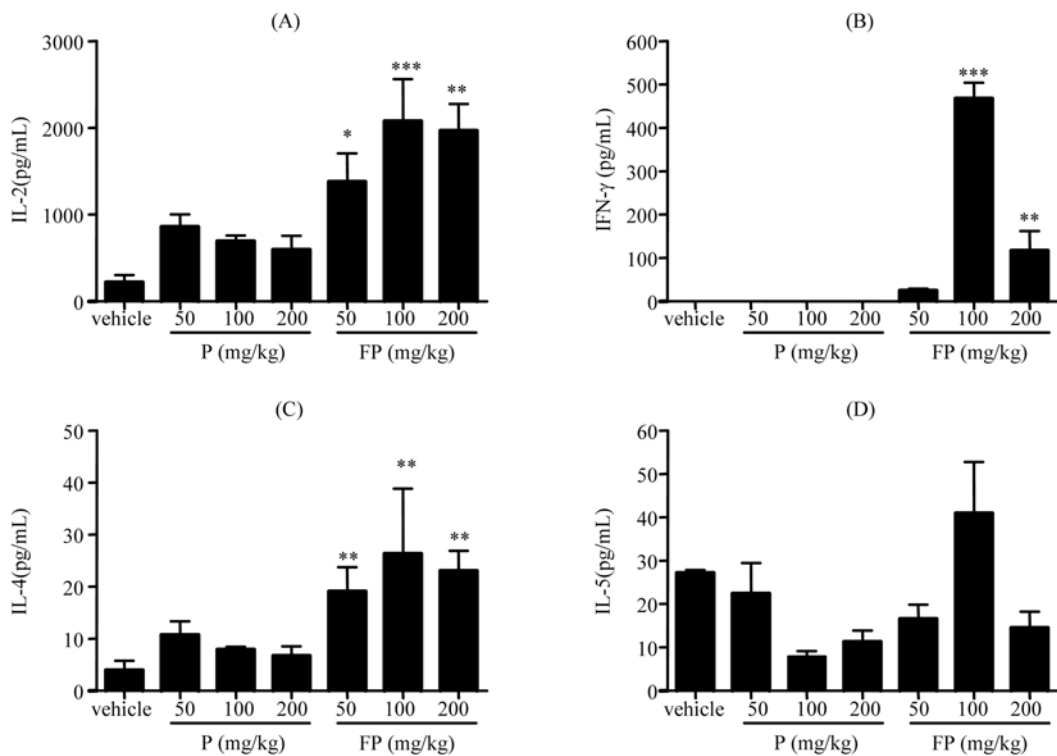
#### 비장 및 창자간막 림프구의 사이토카인 분비능

CD4<sup>+</sup> T 세포는 그들이 분비하는 사이토카인의 종류에 따라 Th-1과 Th-2 T 림프구로 분류된다. Th-1 T 림프구는 세포내 감염(intracellular infection)에 대한 세포매개 면역에 관련되어 IL-2와 IFN- $\gamma$ 를 분비하고, Th-2 T 림프구는 외인성감염(extracellular infection)에 대한 체액성 면역에 관여하는 IL-4와 IL-5를 분비하여, 체내 면역반응을 조절한다(4,21).

프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물 투여에 의한 비장 및 창자간막 림프구의 사이토카인 분비능을 평가하기 위해, 각 림프구를 48 시간 동안 배양한 후, 분비된 사이토카인 농도를 측정하였다(Fig. 2, 3). 프로폴리스 추출물 투여에 의한 비장 림프구에서 사이토카인 분비능은 대조군과 비교하여 유의적인 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 이와 비교하여, 발효 프로폴리스



**Fig. 1. Effects of propolis and fermented-propolis on proliferation of lymphocytes isolated from spleen (A) and mesenteric lymph nodes (B).** Values are means±SEM from triplicate wells. (\*)  $p < 0.01$  and (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. vehicle-treated group.



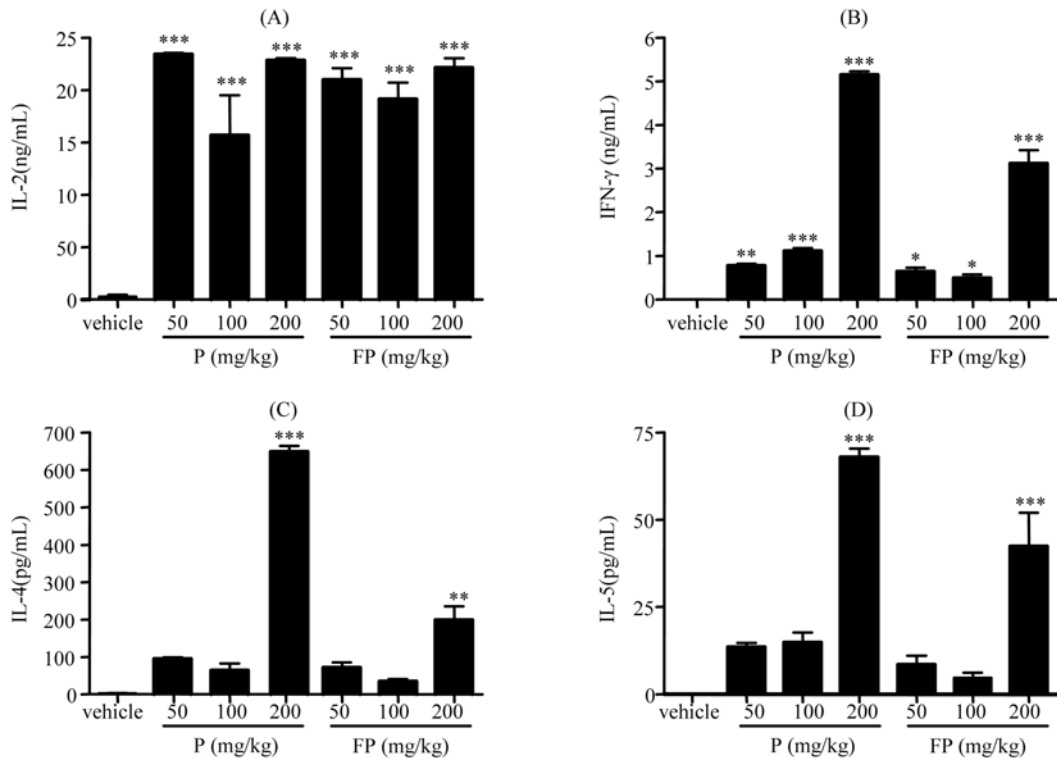
**Fig. 2. Effects of propolis and fermented-propolis on cytokine releases by splenocytes.** Values are means±SEM from triplicate wells. (A) IL-2, (B) IFN-γ, (C) IL-4, (D) IL-5. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  and (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. vehicle-treated group.

추출물 투여군에서는 IL-2, IFN-γ와 IL-4의 분비가 대조군에 비해 유의적으로 증가하고 있음이 관찰되었다. IL-5 생성에 대한 프로폴리스 추출물과 발효 프로폴리스 추출물의 효과는 관찰할 수 없었다(Fig. 2D). 이러한 결과는 비장림프구의 Th-1 및 Th-2 사이토카인 분비능에 있어서 발효 프로폴리스 추출물의 투여가 프로폴리스 추출물 투여에 비해 우월함을 시사하고 있다.

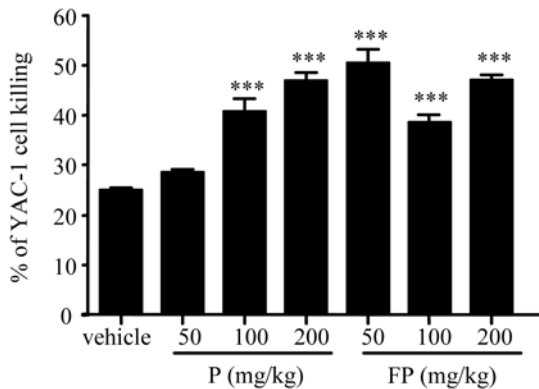
창자간막 림프구의 사이토카인 분비능을 관찰한 결과, IL-2와 IFN-γ와 같은 Th-1 사이토카인은 프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물의 투여(50, 100, 200 mg/kg)에 의해 대조군과 비교하여 유의적으로 증가함을 관찰하였다(Fig. 3A, 3B). IL-4와 IL-5와 같은 Th-2 사이토카인 분비능은 고농도의(200 mg/kg) 프로폴리스 추출물 투여군과 발효 프로폴리스 추출물 투여군이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가되었다(Fig. 3C, 3D). 이러한 결과는 프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물의 투여가 비장 림

프구뿐만 아니라 창자간막 림프구에서의 사이토카인 분비를 유도함을 나타낸다.

IL-2는 T 림프구, B 림프구 및 NK 세포와 같은 림프구의 분화와 증식에 깊이 관여하는 사이토카인이며, IFN-γ는 CD8<sup>+</sup> T 림프구나 NK 세포로 하여금 포식된 미생물이나 항원의 제거를 유도하는 물질이다. IL-4는 B 림프구에 작용하여 항체생산을 촉진하고, naive CD4<sup>+</sup> T 림프구로부터 Th-2 T 림프구로의 분화를 유도하는 주요 사이토카인이다. IL-5는 선천면역(innate immunity) 반응에 중요한 호산구의 성장과 분화를 자극하는 사이토카인이다. 본 실험의 결과는 프로폴리스 및 발효 프로폴리스의 투여가 비장 림프구 및 창자간막 림프구의 Th-1/Th-2 사이토카인의 분비를 유도하여 체내의 면역증강 효과를 나타내는 가능성을 제시하고 있다.



**Fig. 3. Effects of propolis and fermented-propolis on cytokine releases by lymphocytes isolated from mesenteric lymph nodes.** Values are means±SEM from triplicate wells. (A) IL-2, (B) IFN- $\gamma$ , (C) IL-4, (D) IL-5. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. vehicle-treated group.



**Fig. 4. Effects of propolis and fermented-propolis on cytotoxicity of NK cells isolated from spleen.** Values are means±SEM from triplicate wells. (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. vehicle-treated group.

#### NK세포 활성화

NK 세포는 세포 내 미생물에 의해 감염된 세포 및 암세포를 직접 살해하거나, 단핵구나 수지상세포 등과 같은 타 포식세포를 활성화시킬 수 있는 사이토카인을 포함한 수용성인자를 분비하는 세포로 선천면역에 주요한 역할을 담당하고 있는 면역세포이다(22). 프로폴리스 및 발효 프로폴리스 추출물의 경구투여에 의한 NK 세포의 활성화에 대한 영향을 측정하기 위해 각 군의 마우스 비장으로부터 NK 세포를 분리하여 마우스 유래의 종양세포인 YAC-1 세포와 공동배양하여 NK 세포의 YAC-1 세포 살해능을 측정하였다(Fig. 4). 프로폴리스 추출물 투여군의 NK 세포의 활성화는 대조군에 비해 100 mg/kg 투여군과 200 mg/kg 투여군에서 유의적으로 증가하였다. 발효 프로폴리스 추출물 투여군에

서는 모든 농도에서 NK세포의 활성이 대조군에 비해 월등하게 높은 것으로 나타났다. 본 실험에서 프로폴리스 추출물과 발효 프로폴리스 추출물의 투여가 NK 세포 활성능을 증가시키고 있으며, 발효 프로폴리스 추출물이 NK 세포 활성능 증가에 탁월한 효과가 있는 것으로 나타났다.

최근 프로폴리스를 포함한 식품유래의 추출물 및 생리활성 성분의 효능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 프로폴리스의 경우, 주요 생리활성 성분인 CAPE가 항염증작용(23,24), 항암작용(8,9,25) 및 항산화작용(26)을 보이는 것으로 밝혀졌다. 이렇듯 식품을 포함한 천연물유래의 추출물의 효능은 각 추출물 속에 함유된 생리활성 성분의 종류 및 양에 의해 결정된다고 사료된다. 본 연구에서는 프로폴리스 추출물과 발효 프로폴리스 추출물의 생리활성 성분의 종류 및 함량이 상이할 것으로 유추하여, 각 추출물이 면역체계 활성화에 미치는 영향을 비교, 분석하고자 하는 목적으로 수행되었다. 본 연구에서 사용한 발효 프로폴리스 추출물은 프로폴리스 추출물과 비교하여 비장세포의 사이토카인 분비능 및 NK 세포의 활성능이 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 발효 프로폴리스 추출물이 면역활성을 나타내는 생리활성 성분을 다수 포함하고 있다는 것을 시사하고 있으나, 두 추출물간의 생리활성 성분의 비교 및 분석에 관한 세밀한 연구가 수행되어야 할 것이다.

#### 요 약

본 연구는 프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물의 투여에 의한 면역활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 수행하였다. 프로폴리스 추출물 및 발효 프로폴리스 추출물을 체중 kg 당 50, 100, 200 mg/kg의 농도로 BALB/c 마우스에게 14일 동안 연

속적으로 경구투여한 후, 이러한 시험물질 투여에 기인한 비장 림프구와 창자간막 림프구의 증식능, 림프구의 아집단 비율의 변화 및 사이토카인 분비능을 측정하였다. 또한 비장 림프구로부터 NK 세포를 분리하여 YAC-1 세포를 살해하는 NK 세포의 활성을 측정하였다. 그 결과 프로폴리스 및 발효 프로폴리스의 투여에 의해 비장 림프구와 창자간막 림프구의 T 림프구(CD3<sup>+</sup>) 비율이 증가하는 경향을 보였으며, 이는 CD4<sup>+</sup>와 CD8<sup>+</sup> T 림프구 비율의 증가에 기인하였다. 비장 및 창자간막 림프절로부터 분리한 림프구의 증식능도 프로폴리스 및 발효 프로폴리스 투여에 의해 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. Th-1/Th-2 사이토카인 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과 비장림프구에서는 발효 프로폴리스 추출물이 프로폴리스 추출물에 비하여 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4의 분비를 증강시키는 것을 확인할 수 있었다. 창자간막 림프구의 Th-2 사이토카인 분비증강은 고농도(200 mg/kg)의 프로폴리스 및 발효 프로폴리스 추출물 투여군에서만 관찰되었다. 프로폴리스 및 발효 프로폴리스 투여에 의해 YAC-1 세포를 살해하는 NK 세포의 활성도 유의적으로 증가하였다. 이상의 결과로, 프로폴리스 및 발효 프로폴리스 추출물의 경구투여는 체내 면역기능을 증강시킬 수 있는 면역조절제로서의 가능성을 가지는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 산업자원부 지역혁신센터(한림대 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터) 및 한국양봉프로폴리스의 지원으로 얻은 결과임으로 이에 감사를 드립니다.

## 문 헌

- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. Int. Immunopharmacol. 5: 1749-1770 (2005)
- Ryu HS, Kim J, Kim HS. Enhancing effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (*Sorghum, su-su*) extracts on mouse spleen and macrophage cell activation. J. Korean Food Nutr. 19: 176-182 (2006)
- Agarwal BB, Traquna PR, Eessalu TE. Modulation of receptor and cytotoxic response of tumor necrosis factor-L by various lectins. J. Biol. Chem. 261: 13652-13656 (1986)
- Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. Trends Immunol. 23: 201-208 (2002)
- Diefenbach A, Rauler DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. Immunol. Rev. 188: 9-21 (2002)
- Kumazawa SH, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama TS. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. Chem. Pharm. Bull. 51: 740-742 (2003)
- Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2: 29-32 (2005)
- Bazo AP, Rodrigues MAM, Sforcin JM, de Camargo JLV, Ribeiro LR, Salvadori DMF. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. Teratogen. Carcin. Mut. 22: 183-194 (2002)
- El-khawaga O-AY, Salem TA, Elshal MF. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. Clin. Chim. Acta 338: 11-16 (2003)
- Orsolice N, Kosalec I, Ivan B. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against ehrlich ascites tumour. Biol. Pharm. Bull. 28: 694-700 (2005)
- Ivanovska N, Neychev H, Stefanova Z, Bankova V, Popov S. Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation, cytokine release, and *Klebsiella* infection in mice. Apidologie 26: 73-81 (1995)
- Sforcin JM, Fernandes JA, Lopes CAM, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J. Ethnopharmacol. 73: 243-249 (2000)
- Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). Phytomedicine 7: 1-6 (2000)
- Khayyal MT, El-Ghazaly MA, El-Khatib AS. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. Drug Exp. Clin. Res. 19: 197-203 (1993)
- Ledon N, Casaco A, Gonzalez R, Merino N, Gonzalez A, Tolon Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. Acta Pharmacol. Sin. 18: 274-276 (1997)
- Jeong IY. Antioxidant activity and radioprotection of two flavonoids from propolis. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 162-166 (2005)
- Park JH, Lee JK, Kim HS, Chung ST, Eom JH, Kim KA, Chung SJ, Paik SY, Oh HY. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in BALB/c mice. Int. Immunopharmacol. 4: 429-436 (2004)
- Andreia PD, Bianca PO, Fátima HMG, Solange L, De Castro. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. J. Ethnopharmacol. 103: 187-193 (2006)
- Combe CL, Curiel TJ, Moretto MM, Khan IA. NK cells help to induce CD8<sup>+</sup> T cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells. Infect. Immun. 73: 4913-4921 (2005)
- Takagi Y, Choi IS, Yamashita T, Nakamura T, Suzuki I, Hasegawa T, Oshima M, Gu YH. Immune activation and radioprotection by propolis. Am. J. Chin. Med. 33: 231-240 (2005)
- Sá-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: Lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. J. Ethnopharmacol. 87: 93-97 (2003)
- Wu D, Pae M, Ren Z, Guo Z, Smith D, Meydani SN. Dietary supplementation with white button mushroom enhances natural killer cell activity in C57BL/6 mice. J. Nutr. 137: 1472-1477 (2007)
- Song JJ, Gu Cho J, Hwang SJ, Gun Cho C, Park SW, Chae SW. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on LPS-induced inflammation of human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol. 8: 1-5 (2008)
- Jung WK, Lee DY, Choi YH, Yea SS, Choi I, Park SG, Seo SK, Lee SW, Lee CM, Kim SK, Jeon YJ, Choi IW. Caffeic acid phenethyl ester attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine model of ovalbumin-induced asthma. Life Sci. 82: 797-805 (2008)
- Ribeiro U Jr, Safatle-Ribeiro AV. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) may be a promising adjuvant treatment in gastric cancer. J. Clin. Gastroenterol. 41:871-873 (2007)
- Hsu LY, Lin CF, Hsu WC, Hsu WL, Chang TC. Evaluation of polyphenolic acid esters as potential antioxidants. Biol. Pharm. Bull. 28: 1211-1215 (2005)