

사염화탄소로 유도된 간 손상 동물모델에서 차가버섯 열수 추출물이 면역 조절 기능에 미치는 영향

안치선* · 김해란* · 전윤희* · 박종필* · 김종대** · 윤정한** · 임병우*†

*건국대학교 의료생명대학 생명과학부, **강원대학교 의료.바이오신소재융복합연구사업단

Immunoregulatory Effects of Water Extracts of *Inonotus obliquus* in Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage Animal Model

Chi Sun An*, Hai Lan Jin*, Yun Hui Jeon*, Jong Phil Bak*, Jong Dai Kim**, Jung Han Yoon** and Beong Ou Lim*†

*College of Biomedical & Health Science, Department of Life Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea.

**Medical & Bio-material Research Center, Kangwon University, Gangwon 200-701, Korea

ABSTRACT : *Inonotus obliquus* is one of the immune-regulatory substances and is recognized to play the role in the metabolic process of inflammation, allergy and immunity. The purpose of this study was to evaluate the effects of water extracts of *Inonotus obliquus* (IOW) on the liver lymphocyte immune function in the Sprague-Dawley male rats treated with carbon tetrachloride (CCl₄) to induce liver damage. Rats were fed with each experimental diet and water for 4 weeks. We found that effects of IOW on interferon-gamma (IFN-γ), signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), phospho-signal transducer and activator of transcription 1 (pSTAT1) and GATA-binding protein 3 (GATA-3) were decrease in vivo. Interleukin-4 (IL-4), STAT6, pSTAT6 and T-box expressed in T-cells (T-bet) decreased significantly lower in CCl₄ + IOW group than the CCl₄ group. Our data indicated that cytokine protein production were increased in CCl₄ group and CCl₄ + IOW group. As a result of this study, we assume that IOW fed could regulate the immuno-modulating functions through regulate the cytokine production capacity activated by liver damage.

Key Words : Carbon Tetrachloride, *Inonotus obliquus*, Immunoregulatory

서 언

차가버섯은 학명이 *Inonotus obliquus*로 러시아, 캐나다, 일본 홋카이도와 같은 한랭지역에서 자생하는 자작나무, 오리나무, 물푸레나무 등에 기생하는 균핵으로 표면은 검고 내부는 황갈색을 띠고 있으며, 대부분 직경이 10~20 cm 정도의 크기로 주로 약용으로 이용되고 있다 (Shivrina, 1967). 여러 종류의 식물체 중에서도 특히 버섯은 지구상에 널리 자생하며 특유의 맛과 향을 가진 천연자원으로 항암, 항산화, 항당뇨, 항콜레스테롤 작용, 간보호 효과 같은 다양한 약리적 효과를 가진 생리활성의 보고로 알려져 있다 (Cha *et al.*, 2006; Lee and Nishikawa, 2003).

간은 인체에서 가장 큰 장기이며, 소화배설기능, 영양소저장, 새로운 물질합성, 해로운 화학물질을 해독시키는 중요한 역할을 담당하고 있다. 한편 간은 혈액의 흐름이 매우 풍부한

기관으로 혈류를 통한 독성물질의 침투도 용이하게 일어날 수 있다 (Lieber *et al.*, 1994). 간 손상으로 인한 간 장애에 대하여 다양한 치료약이 개발되어 사용되고 있으나 결정적으로 유효한 약물은 별로 없으며, 우리나라를 비롯하여 동아시아 지역에서는 천연물을 기원으로 하는 한약재를 조합한 한방제가 경험적으로 널리 이용되고 있다 (Lee *et al.*, 2006).

간에 들어오는 모든 물질은 cytochrome P450 monooxygenase와 NADPH- cytochrome P450 reductase의 효소반응에 의해서 일차적으로 변환이 일어남으로써 독성물질이 되거나 무독성 물질이 되어 인체에 영향을 미친다 (Cho, 2004). 간 손상을 일으키는 물질에는 carbon tetrachloride(CCl₄), chloroform, phosphorus, dimethyl nitrosamine, thioacetamide 등이 있으며 형태학적인 급성 변화로는 간세포의 종창, 지방성 혹은 소엽 중심성 괴사 등을 초래하고 만성적으로는 간경변증 등을 일으킨다 (Ashburn *et al.*, 1947; Lee *et al.*,

†Corresponding author: (Phone) +82-43-840-3570 (E-mail) beongou@kku.ac.kr

Received 2009 August 27 / 1st Revised 2009 October 28 / 2nd Revised 2009 December 9 / Accepted 2009 December 30

2009). 대표적인 간 독성 물질 중 하나인 CCl₄는 가장 강한 독성을 가진 물질이며 효소반응에 의해 trichloromethyl radicals와 trichloromethyl peroxy radicals (-OCCl₃)을 생성하여 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격함으로써 지질이 산화되어 간세포 용혈을 일으킨다 (McCay *et al.*, 1984; Butler, 1990).

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)는 암세포를 중심으로 일부 T 림프구 또는 비만세포에서 생성되는데, 세균과 같은 병원성 미생물 침입 시 호중구 및 단핵구들을 감염부위로 유인하여 방어 작용을 수행 할 수 있도록 하는 사이토카인이다 (Kim *et al.*, 2003). 그러나 TNF- α 가 과량 생성될 때는 발열이 동반된 전신적 패혈증 쇼크를 초래하게 되는 경우도 있다.

T 림프구는 주위환경의 사이토카인과 전사인자들 (transcription factors)의 활성화에 의해 Th1 세포와 Th2 세포로 분화하며 각각에서 분비되는 사이토카인이 중요한 역할을 한다는 것이 많은 연구에서 보고되었다 (Kay, 1988; Larche *et al.*, 2003). Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-13을 분비하는 특징을 지니고, Th1 세포는 IL-2, IFN- γ , TNF- α 를 생성하는 특징을 가진다 (Abbas *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2008). Th1 및 Th2 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자에는 T-bet, STAT-1, STAT-6, GATA-3 등이 알려져 있는데 T-bet, STAT-1 등의 전사인자가 활성화되면 Th1 림프구로의 분화가 촉진되고, STAT-6, GATA-3 등의 전사인자가 활성화 되면 IL-4 등의 사이토카인과 함께 Th2 림프구로의 분화를 촉진한다 (Agnello *et al.*, 2003).

차가버섯은 다양한 생리활성 효능이 보고되고 있으나 면역 조절 효능에 관한 연구가 미비하며, 특히 간 손상 동물모델에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 실험동물에게 사염화탄소를 이용하여 간 손상 모델을 한 후 차가버섯 열수 추출물의 투여로 면역조절 효능을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 차가버섯의 추출 및 시약

차가버섯 (*Inonotus obliquus*, IOW)은 충북 충주의 생약건 제약재약회에서 구입하였다. 차가버섯을 잘게 절편하여 80 g을 round flask에 넣고 800 ml의 증류수를 가하였다. 80°C의 온도에서 3시간씩 3회 반복하여 환류냉각기로 열수 추출하였다. rotary evaporator (Eyela, Japan)를 사용하여 감압농축 하였고, 이 차가버섯 농축액을 -20°C로 동결 건조하여 보관하며 실험 전에 생리식염수로 용해시켜 사용하였다.

CCl₄ (Carbon tetrachloride)와 Con oil은 Sigma (Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Lysis buffer (T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent)는 Thermo scientific (Rockford, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium

dodesyl sulfate (SDS), acrylamide, bisacrylamide, Tris-HCl 등은 Sigma (Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 항체 TNF- α , STAT1, pSTAT1, STAT6, pSTAT6, β -actin, anti-rabbit IgG은 Cell Signaling Technology (Boston, USA)에서 IL-4, IFN- γ , GATA-3, T-bet, goat anti-mouse, donkey anti-goat는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA)에서 iNOS는 upstate biotechnology에서 구입하였다. IgA와 관련된 항체는 Zymed Laboratory Inc. (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였으며, IgE와 관련된 항체들은 Bio-source International (Comarillo, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 실험동물 및 식이

(주) Orient로부터 구입한 평균체중 120 \pm 10 g의 4주령 Sprague-Dawley (SD)계 rat을 이상적인 항온항습 환경으로 유지하고, 명암주기는 12시간씩 자동적으로 조절되는 환경에서 부드러운 깔짚이 깔린 상자에 적응시키며, 1주일간 식이 및 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 난괴법으로 총 18 마리를 6마리씩 3군 (control군, CCl₄군, CCl₄+ 차가버섯추출물 (IOW)군)으로 나누었다. 1주일간의 예비사육 후 control군을 제외한 군에 대해 간 섬유화 유발을 위해 사염화탄소 (0.5 ml/kg 체중)를 con oil과 50:50의 비율로 희석하여 주 3회 피하주사 하였다. 차가버섯 추출물은 체중 당 (kg) 200 mg 비율로 주 5회 경구 투여하였다. 총 실험은 4주간 진행하였고, 그 후 12시간 절식 후 ether로 안락사 시킨후 혈액을 채취하였다. 간과 비장은 적출하여 생리식염수로 세척한 뒤 -70°C에 보관하며 분석에 사용하였다.

3. Nitric Oxide 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 일산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. Griess 시약은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하였다.

조직 liver를 100 mM Tris-HCl buffer 500 μ l에 넣어 분쇄한 후, 원심분리하여 상층액을 얻었다. 96 well plate에 조직의 상층액 100 μ l를 취하고, 동량의 griess 시약 100 μ l (1% sulfanilamide + 2% phosphoric acid, 0.1% naph-thylethylene diamide dihydrochloride)을 첨가한다. 실온에서 10분간 반응시킨 후, ELISA reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도 (μ M)는 NaNO₂ 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

4. Western blotting에 의한 cytokines 측정

Lysis buffer (25 mM bicine, 150 mM sodium chloride, pH 7.6)에 조직 100 mg을 넣고 초음파 분해한 후 4°C에서 10

분간 반응시킨다. 이 후 4°C, 14000 rpm, 10분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 상층액은 bovine serum albumin (BSA, Roche, Penzberg, Germany)으로 작성한 standard curve에 OD값을 대입시켜서 단백질 양을 Bradford protein assay 방법으로 조사하였다. 그 후에 bio rad protein assay 방법으로 단백질을 정량하여 100 µg의 단백질을 취했다. 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane (Bio-rad, Richmond, CA, USA)에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 반응시킨 후, 각 검출 단백질에 대한 항체를 가하여 overnight시켰다. 다음날 0.1% Tween 20을 함유한 TBS-T 용액으로 30분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL detection reagents and analysis system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 표적 단백질을 확인하였다 (Burnette, 1981).

5. ELISA을 이용한 IgA, IgE 생성량 측정

혈청과 배양한 임파구 상층액의 IgA와 IgE 함량은 Sandwich ELISA법 (Lim *et al.*, 2003)을 이용하여 측정하였다. 측정 방법은 50 mM carbonate-bicarbonate buffer와 IgA, IgE 일차항체를 96 well plate의 각 well에 분주한 후 37°C에서 2시간 incubation한다. 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 blocking buffer를 넣어 37°C, 1시간 incubation한다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후, sample을 분주하고 37°C, 1시간 incubation한다. 3회 washing 완충용액으로 세척한 후, di (2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmonate (TMB) 기질을 100 µl 씩 처리하여 10~15분간 반응시킨 후 100 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 측정하였다.

6. 통계처리

본 연구의 실험결과는 mean ± SE으로 나타내었으며, 각 group간의 통계적 유의성 검증은 SPSS program (ver. 14.0,

SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 p < 0.05 수준에서 Duncan의 다중비교법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. 체중증가량 및 장기무게

실험식이를 4주간 투여한 실험동물의 평균 체중증가량 및 장기 무게의 변화를 Table 1에 나타내었다. 체중증가량은 각 실험군인 정상군과 대조군, 실험식이 섭취군의 실험 시작 평균체중이 334.7 ± 9.0, 309.0 ± 24.3 및 299.0 ± 23.9 g이었으나 실험 마지막 평균체중이 421.2 ± 17.6, 360.8 ± 36.6 및 360.0 ± 43.8 g으로 세 군 모두에서 실험기간이 지남에 따라 증가하는 것을 나타내었고, 대조군과 실험식이 섭취군에서 체중 차이는 보이지 않는다. 사염화탄소 투여에 대한 황금 추출물 섭취가 장기무게에 미치는 효과를 알아보기 위하여 비장과 간의 무게를 측정하였다. 비장의 무게는 각각 0.5 ± 0.1, 0.4 ± 0.1 및 0.5 ± 0.1 g으로 실험군간의 유의적 차이는 나타나지 않았고, 간의 무게는 각각 8.4 ± 1.1, 9.1 ± 1.9 및 8.5 ± 1.6 g으로 정상군에 비해 사염화탄소를 투여한 대조군이 높았으며, 실험식이 섭취군이 정상군과 비슷한 무게를 나타내었다. 이는 사염화탄소로 유도된 염증성 반응으로 간 중량의 증가에 의한 결과로 생각된다.

2. ELISA을 이용한 Immunoglobulin A and E 항체 측정

혈청과 비장에서의 IgA와 IgE의 농도를 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. 혈청 IgA 농도는 정상군, 대조군, 실험식이 섭취군에서 각각 116.593 ± 0.048, 131.148 ± 0.053 및 117.037 ± 0.052 ng/ml로 측정되었으며, 사염화탄소로 유도된 군이 다른 군에 비해 생성량이 높게 나타났고 실험식이 섭취군의 생성량이 정상군의 생성량과 비슷하게 나타났다. 혈청 IgE 농도는 정상군, 대조군, 실험식이 섭취군에서 각각 2.694 ± 0.004, 2.906 ± 0.007 및 2.129 ± 0.009 ng/ml로 사염화탄소를 유도한 군에서 다른 군보다 높았으며, 실험식이 섭취군이 정상군보다 낮았다. 비장의 IgA 농도는 정상군, 대조군, 실험식이 섭취군에서 각각 44.926 ± 0.010, 46.037 ± 0.024 및

Table 1. Effect of body and organs weight of CCl₄-treated rats.

	Body weight (g)		Organs weight (g)	
	Initial	Final	Liver	Spleen
A	334.7 ± 9.0	421.2 ± 17.6 ^a	8.4 ± 1.1 ^b	0.5 ± 0.1
B	309.0 ± 24.3	360.8 ± 36.6 ^b	9.1 ± 1.9 ^a	0.4 ± 0.1
C	299.0 ± 23.9	360.0 ± 43.8 ^b	8.5 ± 1.6 ^b	0.5 ± 0.1

(A) Normal group

(B) CCl₄-treated group

(C) CCl₄-treated group + *Inonotus obliquus* extract

Values (n = 6 for each group), not sharing a common superscript letter are significantly different (p < 0.05).

Table 2. Effect of *Inonotus obliquus* on the serum and spleen immunoglobulin A and E production of CCl₄-treated rats.

	Serum (ng/ml)		Spleen (ng/ml)	
	IgA	IgE	IgA	IgE
A	116.593 ± 0.048 ^b	2.694 ± 0.004 ^b	44.926 ± 0.010 ^b	2.194 ± 0.004 ^b
B	131.148 ± 0.053 ^a	2.906 ± 0.007 ^a	46.037 ± 0.024 ^a	3.675 ± 0.006 ^a
C	117.037 ± 0.052 ^b	2.129 ± 0.009 ^c	40.543 ± 0.010 ^c	3.282 ± 0.006 ^c

(A) Normal group, (B) CCl₄-treated group, (C) CCl₄-treated group + *Inonotus obliquus* extract, Values, n = 6 for each group, not sharing a common superscript letter are significantly different (p < 0.05).

40.543 ± 0.010 ng/ml로 측정되었으며, 정상군에 비해 사염화탄소로 유도된 군의 생성량이 높게 나타났고 실험식이 섭취군의 생성량이 정상군보다 낮게 나타났다. 비장의 IgE 농도는 정상군, 대조군, 실험식이 섭취군에서 각각 2.194 ± 0.004, 3.675 ± 0.006 및 3.282 ± 0.006 ng/ml로 사염화탄소로 유도한 군에서 높게 나타났으며 실험식이 섭취군에서 조금 낮은 생성량을 나타내었다.

3. Nitric oxide(NO) 생산량 및 iNOS 단백질 측정

차가버섯 열수추출물이 염증 유발에 관여하는지 여부를 판단하기 위하여 사염화탄소에 의해 유도된 간 손상의 liver 조직에 griess 시약을 사용하여 NO량과 iNOS 단백질 발현량을 확인한 결과, Fig 1, 2에서와 같이 각각 5.85 ± 0.14, 10.92 ± 0.86 및 7.03 ± 0.23 μM/ml로 NO 생성량이 사염화탄소로 유도함으로써 정상군에 비해 대조군에서 높게 나타났고 실험식이 섭취군에서 낮게 나타나 NO 생성 억제를 관찰할 수 있었다. NO 생성 억제기작에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 westernblot analysis를 이용하여 iNOS 단백질의 발현을 조사한 결과, 모든 군에서 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다.

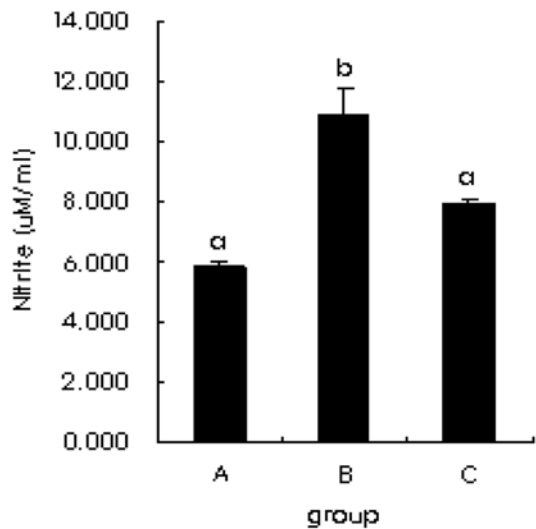


Fig. 1. Effect of *Inonotus obliquus* on the NO production in liver. NO production from liver was determined in culture supernatant by griess reagent. Values (n = 6 for each group), not sharing a common superscript letters are significantly different (p < 0.05). (A) Normal group, (B) CCl₄-treated group (C) CCl₄-treated group + *Inonotus obliquus* extract

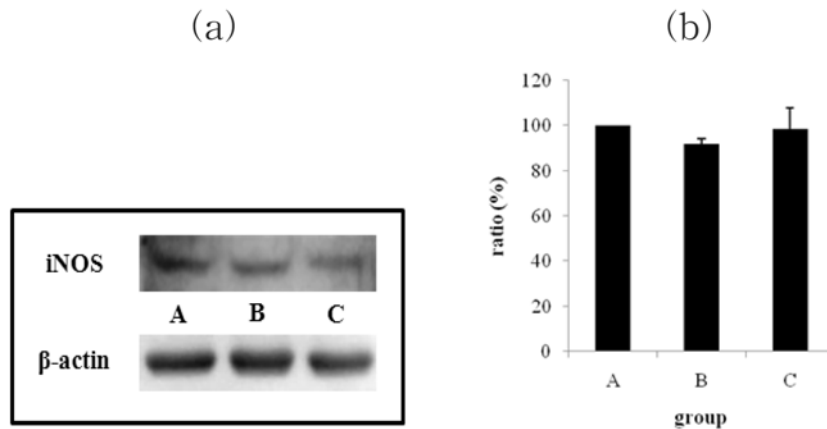


Fig 2. Effect of *Inonotus obliquus* on the iNOS expression in liver. (a) Expression of iNOS protein was determined by western blotting. Actin was used as an internal control. (b) Protein bands were quantified by densitometry (n = 6 for each group). (A) Normal group, (B) CCl₄-treated group, (C) CCl₄-treated group + *Inonotus obliquus* extract

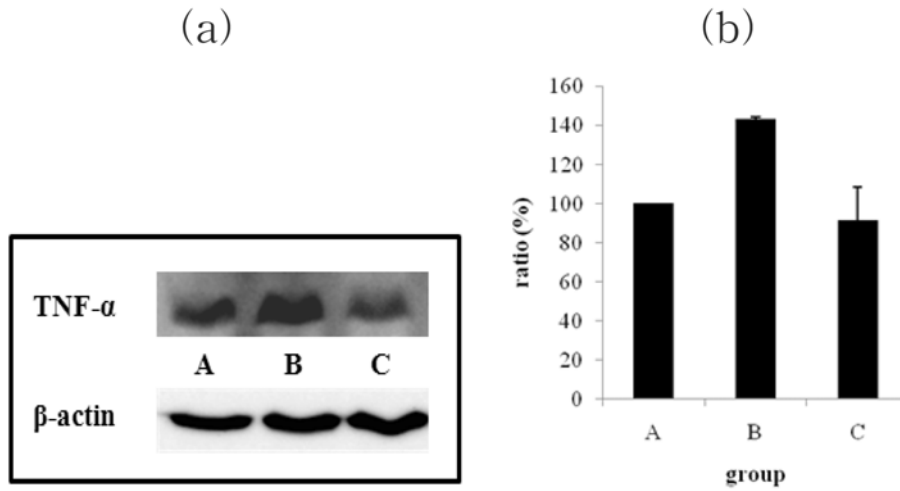


Fig. 3. Effect of *Inonotus obliquus* on the TNF- α expression in liver. (a) Expression of TNF- α protein was determined by Western blotting. specific anti TNF- α antibodies. Actin was used as on internal control. (b) Protein bands were quantified by densitometry (n = 6 for each group). (A) Normal group, (B) CCl₄-treated group, (C) CCl₄-treated group + *Inonotus obliquus* extract.

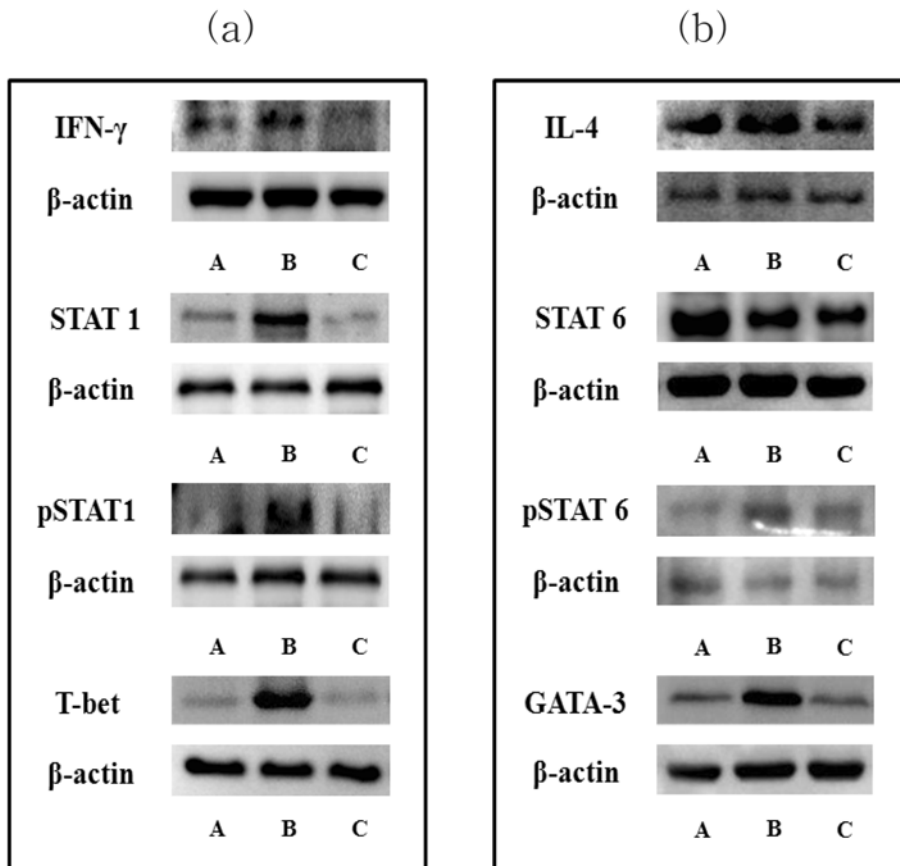


Fig. 4. Effect of *Inonotus obliquus* on the IFN- γ , STAT1, pSTAT1 and T-bet expression in liver. (a) Expression of IFN- γ , STAT1, pSTAT1 and T-bet protein was determined by Western blotting. Actin was used as on internal control. (b) Expression of IL-4, STAT6, pSTAT6 and GATA-3 protein was determined by Western blotting. specific anti IL-4, STAT6, pSTAT6 and GATA-3 antibodies. Actin was used as on internal control (n = 6 for each group). (A) Normal group, (B) CCl₄-treated group, (C) CCl₄-treated group + *Inonotus obliquus* extract.

4. Westernblot을 이용한 cytokines 측정

사염화탄소로 유도된 흰쥐의 조직에서 차가버섯 열수 추출물의 영향을 알아보기 위해 cytokines의 발현정도를 단백질의 양적인 수준에서 검증하기 위하여 실험한 결과를 Fig. 3, 4에 나타내었다. 면역반응과 염증반응의 발현과 조절에 있어 중요한 역할을 담당하는 친염증성 사이토카인인 TNF- α 발현량을 보면 사염화탄소로 유도한 대조군이 정상군이 정상군에 비해 높은 발현을 나타내었고, 실험식이 섭취군에서 발현량이 감소하는 것을 나타내었다. Th1 type 성향인 IFN- γ 와 STAT1, pSTAT1 그리고 T-bet의 발현은 정상군에 대해 대조군에서 높은 발현을 실험식이 섭취군에서 발현이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. Th2 type인 IL-4와 STAT6, pSTAT6 그리고 GATA-3의 발현량 또한 대조군이 정상군보다 높은 발현을 나타내었고, 실험식이 섭취군에서 발현량이 줄어드는 것을 볼 수 있었다.

고 찰

본 연구는 사염화탄소의 투여로 유발된 흰쥐의 간 손상에서 면역조절 기능에 미치는 영향을 확인하고자 흰쥐에 차가버섯 열수 추출물을 4주간 투여하여 간 조직에서 사이토카인의 발현과 함께 면역 글로불린의 변화를 확인하였다.

면역 글로불린은 항체 (antibody)라고도 불리며, IgA, IgD, IgE, IgG 그리고 IgM으로 분류된다. 혈청과 비장에서 IgA 생성량을 보면 대조군에서 높은 생성량을 차가버섯 열수추출물을 투여한 군에서 그 생성량이 감소하였고, IgE 생성량 또한 같은 감소현상을 보였다. 체액과 같은 외분비액의 중요한 면역 글로불린으로 B림프구의 표면과 같은 점막표면에서 주요한 특이 체액성 방어 메커니즘을 형성하는 IgA는 입자상 항원에 대한 항체로서 항원의 인식과 항체합성에 중요한 역할을 하며, 특히 알레르기, 천식, 기생충 감염의 경우 등에서 함량이 상승한다고 보고되어 왔고 (Tharp and Barnes, 1990), IgE는 B림프구 표면의 항원 수용체 작용과 B림프구의 분화에 관여하며 정상인의 면역 글로불린의 약 0.002%의 항체를 구성하고 알러지 작용과 염증을 억제한다 (Na JC and Seo HG, 2002). 이에 면역 조절 기능뿐만 아니라 염증 예방에 효과가 있는 것으로 사료된다.

체내 염증 과정에서는 과량의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증인자가 유도형 NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase (COX-2)에 의해 형성된다 (Moncada et al., 1991; Nathan, 1992). 간에서의 NO 생성량을 확인한 결과, 사염화탄소로 인한 간 조직 손상군보다 실험식이 섭취군에서 낮은 생성량을 보였다. 일반적인 NO형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키

게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 유발한다 (Stuehr et al., 1991; McCartney-Francis et al., 1993; Weisz et al., 1996). 이는 사염화탄소에 의해 생성된 NO를 차가버섯 열수추출물의 투여로 억제시킴으로서 염증 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

Cytokine은 호르몬과 유사한 기능을 해서 면역 세포들이 서로 대화하는데 도움을 주는 작은 단백질이고, 면역 세포의 분화와 면역 조절에 중요한 역할을 하며, 자가면역 질환의 발생과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Wood, 2001; Falcone and Sarvetnick, 1999). 염증 초기반응에서 활성화된 TNF- α 의 발현을 확인하였을 때, 대조군이 사염화탄소로 인해 높은 발현을 나타내었고 차가버섯 열수추출물을 섭취시킨 군에서 그 발현을 감소시켜 TNF- α 의 생성을 억제시키는 것을 확인하였다. 알레르기 염증반응에 참여하는 유전자에 여러 종류의 전사인자가 조절에 관여하는데 Th1 및 Th2 분화에는 전사인자 T-bet과 GATA-3가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Escoubet-Lozach et al., 2002). T-bet은 Th1아형으로의 분화에 중요하다. 그래서 T-bet의 발현이 증가되면 Th1세포로 분화가 촉진되고 상대적으로 Th2세포 분화는 억제하게 된다. 또한 IFN- γ 및 IL-12의 분비를 촉진하여 IgE 생성이 감소한다. 이와 반대로 GATA-3는 IL-4와 IL-5의 전사를 조절하고 Th2 세포분화를 촉진한다 (Zhang et al., 1999; Finotto et al., 2002). 이 연구를 명확하게 하기 위해서는 우선 Th1과 Th2 세포로 분화를 촉진하는 T-bet 및 GATA-3 각각의 세포에서 발현되는 IFN- γ , IL-4, STAT1, STAT6 등의 발현양상을 같이 평가하는 것이 필요하고 이것이 결과를 해석하는데 도움이 될 것으로 보인다. Th1 세포의 분화에 영향을 미치는 IFN- γ , STAT1, pSTAT1, T-bet의 발현을 관찰하였는데, 대조군으로 사염화탄소 유도군에서 높은 발현을 나타내었고, 차가버섯 열수 추출물 섭취군에서 그 발현이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. Th2 세포의 분화에 영향을 미치고 IgE 분비에 관여하는 IL-4, STAT6, pSTAT6, GATA-3의 발현 역시 관찰하였는데, 이 또한 같은 양상으로 대조군에서 높은 발현을 차가버섯 열수 추출물 섭취군에서 그 발현이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 위 같은 실험결과는 사염화탄소의 유도가 차가버섯 열수 추출물의 투여로 면역 조절 작용이 있음을 알 수 있었다.

최근에는 차가버섯 열수추출물이 항산화 효과 (Song et al., 2004), 차가버섯 수용성 추출물이 대장암세포 HCT-15 및 위암세포 AGS를 억제한다 (Cha et al., 2004)고 보고하였다. 천연물 유래의 항종양 활성을 가진 생리활성물질 탐색은 선진국을 중심으로 세계 각국에서 이루어지고 있으며, 독성이 낮으면서 비교적 안전성이 확보된 우리의 일상적인 식생활에 밀접한 소재로부터 쉽게 접근이 가능하면서도 탁월한 항종양효과를 나타내고 있는 버섯류에 관심이 증대되고 있다 (Kim et al., 1998; Ng and Yap, 2002; Ham et al., 2003).

본 실험 결과 면역 글로불린과 여러 사이토카인의 형성 억제제가 차가버섯 열수 추출물이 흰쥐에서의 사염화탄소로 유발된 간독성에 대한 면역 활성이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Abbas AK, Murphy KM and Sher A.** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793.
- Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'shea JJ and Frucht DM.** (2003). Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *Journal of Clinical Immunology*. 23:147-161.
- Ashburn LL, Endicott KM, Daft FS and Little RD.** (1947). The nonportal distribution of trabecule in dietary cirrhosis of mouse and huinea pigs. *American Journal of Pathology*. 23:159.
- Burnette WN.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 112:195-203.
- Butler TC.** (1990). Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissue and tissues constituents. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 134:311-319.
- Cha JY, Jun BS, Park JW, Moon JC and Cho YS.** (2004). Effect of fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* on growth of human AGS gastric and HCT-15 colon cancer cells. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 47:202-207.
- Cha JY, Jun BS, Yoo KS, Hahn JR and Cho YS.** (2006). Fermented chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) effects on hypolipidemia and hepato protection in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Journal of Food Science and Biotechnology*. 15:122-127.
- Cho MH.** (2004). The base of toxicology. *Young Chi* (ed). p.116-120.
- Escoubet-Lozach L, Glass C and Wasserman S.** (2002). The role of transcription factors in allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 110:553-564.
- Falcone M and Sarvetnick N.** (1999). Cytokines that regulate auto-immune responses. *Current Opinion in Immunology*. 11:670-676.
- Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley Kathleen, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, Sanctis GT and Glimcher LH.** (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. 295:336-338.
- Ham SS, Oh SW, Kim YK, Shin KS, Chang KY and Chung GH.** (2003). Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32:1088-1094.
- Kay AB.** (1988). Leukocytes in asthma. *Immunol Invest*. 17:679-705.
- Kim HA, Kim EA, Park YC, Yu JY, Hong SK, Jeon SH, Park KL, Hur SJ and Heo Y.** (2003). Immunotoxicological effects of agent orange exposure to the Vietnam War Korean veterans. *Industrial Health*. 41:158-166.
- Kim SW.** (1998). Studies on anti-microbial and anti-cancer function of polysaccharide extracted *Ganoderma lucidum*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 27:1183-1188.
- Larche M, Robinson DS and Kay AB.** (2003). The role of T lympho-cytes in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111:450-463.
- Lee KW, Nam BH, Jo WS, Oh SJ, Kang EY, Choi YJ, Lee JY, Cheon SC, Jeong MH and Lee JD.** (2006). Collection, classification and hepatic effect of native *Cordyceps militaris*. *Korean Journal of Mycology*. 34:7-13.
- Lee IS and Nishikawa A.** (2003). Polyzellus multiplex, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sciences*. 73:3225-3234.
- Lee SE, Park CG, Ahn YS, Son YD, Cha SW and Seong NS.** (2009). Antioxidative and hepatoprotective effects of *Lythrum salicaria*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:1-7.
- Lieber CS.** (1994). Alcohol and the liver. *Gastroenterology*. 106:1085-1105.
- Lim BO, Choue RW, Lee HY, Seong NK and Kim JD.** (2003). Effect of the flavonoid components obtained from *Scutellaria Radix* on the histamine, immunoglobulin E and lipid peroxidation of spleen lymphocytes of Sprague-dawley rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 67:1126-1129.
- Lim BO, Park PJ, Choi WS and Kim JD.** (2008). *Scutellaria baicalensis* modulates cytokine production, T cell population and immunoglobulin level by mesenteric lymph node lymphocytes in experimental mice with colitis. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:100-105.
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF and Wahl SM.** (1993). Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*. 178:749-754.
- McCay PB, Lai EK, Poyer JL, Dubose CM and Janzen EG.** (1984). Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 259:2135-2143.
- Mizuno T, Zhuang C, Abe K, Okamoto H, Kiho T, Ukai S, Leclerc S and Meijer L.** (1999). Antitumor and hypohyemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fe.) Pil. (Aphyllporomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1:301-316.
- Moncada S, Palmer RM and Higgs EA.** (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43:109-142.
- Na JC and Seo HG.** (1992). Effect of 12 weeks combined running and muscular resistance eExercise on physical fitness in obese female. *Korean Alliance for Health, Physical Education,*

- Recreation and Dance. 40:440-447.
- Nathan C.** (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. The Federation of American Societies for Experimental Biology. 6:3051-3064.
- Ng ML and Yap AT.** (2002). Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). Journal of Alternative and Complementary Medicine. 8:581-589.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF and Nathan CF.** (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88:7773-7777.
- Tharp GD and Barnes MW.** (1990). Reduction of saliva immunoglobulin levels by swim training. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology. 60:61-64.
- Weisz A, Cicatiello L and Esumi H.** (1996). Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. Biochemical Journal. 316:209-215.
- Wood P.** (2001). Understanding immunology. Prentice Hall, Harlow, England. p.22-24.
- Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P and Ray A.** (1999). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. Immunity. 11:473-482.