

## Inhibitory Effects of a New Herbal Composition (HemoHIM) on UVB-Induced Suppression of Langerhans Cell's Accessory Cell Function

Jong-Jin Kim<sup>1</sup>, Sung-Keel Jo<sup>2</sup>, Uhee Jung<sup>2</sup>, Hae-Ran Park<sup>2</sup> and Sung-Tae Yee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, College of Life Science and Natural Resources, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

<sup>2</sup>Radiation Research Division for Bio-Technology, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup campus of Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup, 580-185, Korea

Received November 4, 2011 / Revised December 20, 2011 / Accepted December 20, 2011

In the previous results, we developed an effective products to apply as functional foods for overcome of radiation damage and reduction of side effects in radiotherapy. To verify the prevention of UVB-induced immunosuppression of immune cell function by HemoHIM, we studied on the mechanism of the skin immune function for the protection in UVB irradiation. In studies presented here, we showed that HemoHIM can prevent UVB-induced impairment of skin immune cell function by *in vitro* and *in vivo* assay. Exposure of freshly cultured murine dendritic cells (DCs) with IL-4/GM-CSF to UVB irradiation resulted in impairment of accessory function. This suppression could be prevented by addition of HemoHIM before or after to the cultures of UVB-irradiated DCs. We also tested the effects of HemoHIM on the suppression of contact hypersensitivity (CHS) treated oral or intraperitoneal administration. This UVB-suppressed CHS was prevented by administration of HemoHIM to UVB-irradiated mice. These results suggest that HemoHIM may prevent UVB-induced immune suppression in the skin.

**Key words** : HemoHIM, dendritic cells, contact hypersensitivity (CHS), ultraviolet B, T cells

### 서 론

피부는 외부 환경과 자외선으로부터 신체를 보호하고 있다. 자외선을 포함하는 태양광의 에너지는 신체 내부까지 도달하지 못하고 피부의 일정부분 밖에 들어가지 못한다. 태양광 중에서 지표까지 도달하는 것은 파장이 290 nm 이상으로 파장이 짧은 UVC (200~280 nm)는 거의 표피까지 밖에 도달하지 못하고, UVB (280~320 nm)는 일부만 진피까지, UVA (320~420 nm)는 진피까지 도달한다[17]. 인체에 대한 자외선의 영향 가운데 가장 잘 알려져 있는 것이 피부에 대한 영향이다[28]. 일반적으로 햇빛 쏘임이라 불리고 있는 현상은 피부가 붉게 되는 홍반(sunburn 현상)과 피부가 검게 되는 색소침착(suntan 현상)으로 자외선에 노출되어 홍반이 생기면 방어작용으로써 색소침착이 생긴다[24]. 태양광에 노출된 피부는 혈관이 확장되고 혈류와 혈관 투과성이 증가하여 붉게 되는데, 주로 UVB에 의한 영향이다. 색소침착은 주로 UVA에 의해 표피의 기저층에 있는 멜라노사이트가 자극되어 멜라닌이란 색소가 증가하는 경우와 UVB에 피폭되어 홍반이 생긴 후에 방어작용으로서 멜라노사이트가 자극되어 2차적인 색소침착이 일어난다[3].

장기간에 걸쳐 피부가 자외선에 노출되면 피부 노화가

촉진되고 피부암의 발생 가능성이 높아진다[2]. 즉 진피 결합조직이 오랫동안 자외선에 노출되면 피부가 얇아지고 주름이 증가하고 거칠어지며 가볍게 부딪혀도 피하출혈이 발생한다. 자외선이 피부암의 주요 원인의 하나인 것은 각종의 역학조사에 의해 보고되고 있다[14]. 즉 피부암은 두부, 경부, 팔, 손 등 의복으로 가려지지 않은 부위에 주로 발생하며, 노출된 자외선량과 상관관계가 있으며 태양광에 노출되는 기회가 많은 야외 노동자들에게서 발병률이 높다. 그리고 태양광의 강도가 높은 적도 지방의 사람의 피부암 발병률이 높고 동물실험에서 자외선 반복조사에 의해 피부암이 쉽게 발생한다. UVB (280~320 nm)는 진피 상부층까지 도달하고, 급속한 화상이나 홍반을 일으키며 만성 노출시 피부암을 유발하는데 피부암의 약 90%가 UVB에 의해 유발된다[30]. 따라서 본 연구에서는 자외선 중에서 화상과 암을 유발하는 UVB를 대상으로 하였다.

피부 면역계는 숙주 방어에 능동적으로 참여하여 면역 및 염증 반응을 일으킨다[23]. 특히 피부 밑에 있는 Langerhans 세포는 피부로 침입하는 항원을 포획하고 림프절로 이동한다. 림프절로 이동한 Langerhans 세포는 T 세포에 항원을 제시하여 T 세포를 활성화시켜 증식반응과 사이토카인 분비를 유도하여 세포성 면역반응(cell-mediated immune response)을 유발한다[22,26]. 이러한 T 세포에 의한 세포매개성 면역반응은 UVB조사에 의해 억제되는데[6,29], 본 실험에서는 UVB로 억제되는 세포성 면역반응을 방호하는 생약복합 조성

#### \*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3618, Fax : +82-61-750-5469

E-mail : sungtae@sunchon.ac.kr

물(HemoHIM)의 효과를 살펴보았다.

본 연구팀은 한의학에서 사용하는 다양한 생약재와 한약처방제의 방사선에 대한 방호효과를 보고한 바 있으며 [5,9-13,16,19], 세 종류의 생약재(당귀, 천궁, 백작약)를 이용하여 새로운 생약복합물을 개발하여 면역세포 활성화 효과, 면역·조혈계 회복촉진 효과, 재생조직 및 면역조혈계의 방어 효과, 항산화 효과에 대해 보고하였다[21]. 그리고 면역 및 조혈기능 활성화 효과가 강화된 새로운 생약복합조성물을 개발하여 방사선에 의한 위장관 및 면역계 조직의 손상을 감소시켜 생존을 증가시키는 면역조혈세포 방호 및 회복촉진 효과를 보고하였다[4]. 그리고 항암 치료제와 함께 투여하였을 때, 화학치료제의 독성을 줄이면서 항암 효과를 증가시키는 효과도 보고하였다[20].

자외선에 의한 면역반응 억제 및 피부암의 유발 등을 피하는 가장 좋은 방법은 자외선 조사를 피하는 것이지만, 여러 가지 이유로 자외선 노출을 피할 수 없는 경우에는 자외선 차단제를 사용하는 것이다. 그러나 현재 사용되고 있는 자외선 차단제는 자외선에 의한 피부화상을 예방할 목적으로 개발된 것으로, 최근의 연구 결과에 의하면, 자외선에 의한 피부화상의 차단이 자외선에 의해 억제되는 면역반응의 예방과는 일치하지 않는다는 것이다. 즉 자외선에 의한 피부화상은 예방할 수 있으나, 자외선에 의해 억제되는 세포성 면역의 회복 또는 예방효과는 없거나 약한 것으로 밝혀지고 있다. 따라서 자외선 차단제의 사용은 피부화상을 방지함으로써 오히려 자외선에 대한 노출시간을 증가시키고, 결과적으로 면역반응의 억제 및 피부암 유발을 촉진시킬 수 있다.

본 연구에서는 자외선 차단제가 아니라, 방사선에 대한 생체방어 기능성 식품으로 개발된 생약복합조성물(HemoHIM)이 자외선에 의해 억제된 세포성 면역반응을 경감 또는 회복시킬 수 있는지 그 효과를 검증하는 것을 목표로 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

실험동물은 (주)대한바이오링크(충청북도 음성군, 대한민국)에서 특정병원체부재(specific pathogen free) C57BL/6를 공급받아 실험동물 사육실에서 사육상자당 5개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 생쥐는 일정한 온도(24±1°C)에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 생후 8~12주 사이의 생쥐를 실험에 사용하였다.

### 사용시약

세포 배양에 필요한 RPMI-1640, FBS (Fetal Bovine Serum), 항생제(antibiotic-antimycotic)는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, 접촉성과민반응의 유도에 필

요한 DNCB (1-Chloro-2, 4-Dinitrobenzene), DNBS (2, 4-Dinitrobenzen-sulfonic acid dihydrate)와 olive oil, 그리고 2ME (2-mecaptoethanol), OVA (ovalbumin), MMC (Mitomycin C), sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), acetone은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 세포의 증식반응을 측정하는데 사용한 Cell titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell proliferation Assay은 Promega (Madison, WI, USA) 제품을 사용하였고, recombinant mouse GM-CSF와 IL-4는 R&D 제품을 사용하였다.

### 생약복합조성물(HemoHIM) 및 분획의 제조

생약복합조성물(HemoHIM)은 아래와 같은 방법으로 제조한 시료를 (주)선바이오텍에서 제공받아 사용하였다. 서울 경동 한약재 시장에서 구입한 생약재 3종, 즉 당귀(Danggui, *Angelica gigas* Nakai)의 뿌리, 천궁(Chuanxiong, *Cnidium officinale* Makino)의 근경, 백작약(Baishaoyao, *Paeonia japonica* Miyabe)의 뿌리를 동일한 무게비율로 혼합한 후, 혼합 생약재 100 g당 증류수 1,000 ml을 가하고 4시간 열탕 추출하였다. 추출물의 고형분을 제거하고 감압농축하여 생약복합물 HIM-I을 얻었다. HIM-I의 일부를 취하여 4배 부피의 100% 에탄올 주정을 첨가하고(최종 에탄올 농도 약 80%), 25°C 이하에서 16시간 정치한 후, 원심분리하여 침전된 조다당 분획(HIM-I-P)과 상층의 에탄올 분획(HIM-I-E)을 수거하였다. 수거한 조다당 분획의 일부를 이에 해당하는 HIM-I에 첨가하여 생약복합조성물 HemoHIM을 제조하였다. 제조한 HemoHIM은 동결건조하여 냉동저장하였으며, 실험 직전에 증류수에 녹여 사용하였다.

### 시료의 처리

시료는 다음과 같이 두 가지 방법으로 처리하고 그 효과를 관찰하였다. 즉 HemoHIM을 UVB를 조사하기 24시간 전과 조사 후 30분 이내에 복강으로 1 mg씩 투여하거나, 먹는 물에 첨가하여 3주 동안 경구투여(0.5~1 mg/day)한 후 UVB를 조사하였다.

### 수지상 세포 배양

생쥐(C57BL/6)를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 1 ml 주사기를 이용하여 대퇴골(femur)과 경골(tibia)안에 있는 골수를 분리하여 단일세포로 만들었다. 적혈구 용해 완충액(Tris-buffered ammonium chloride; 90 ml of 0.16 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 ml of 0.17 M Tris, PH 7.2)을 처리하여 적혈구를 제거한 후, washing용액으로 1,200 rpm에서 5분간 3회 원심 분리하여 충분히 세척한 다음, 혈구계산반을 이용하여 세포수를 계산하였다. GM-CSF (1,000 U/ml)와 IL-4 (1,000 U/ml)가 포함된 배지(RPMI 1640, FCS 10%)에 부유된 골수세포(1×10<sup>6</sup>개/5 ml/well)를 6 well culture plate에서 배양하였다. 4일 후

새 배지 1 ml과 동량의 GM-CSF와 IL-4를 첨가하고 3일간 더 배양한 후 세포를 5분간 shaking하여 가볍게 부착되어있는 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 washing용액으로 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 충분히 세척한 다음, 세포 ( $2.5 \times 10^6$ 개/5 ml/well) 배양액에 HemoHIM을 농도별(1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ )로 첨가한 다음에 24시간 배양하고 회수하여 실험에 사용하였다.

#### 수지상세포에 자외선 조사

생쥐 골수에서 GM-CSF와 IL-4로 유도 배양한 수지상 세포를 회수하여 PBS에 현탁한 후 동량의 세포 수( $3 \times 10^5$ )를 6 well plate에 넣고 1,200 rpm, 3 min (25°C), 원심 침전하여 배양접시의 바닥에 가라앉힌 다음에 UVB lamp (F20T10, Sankyo denki, Japan)를 이용하여 1초에 1  $\text{mJ/cm}^2$ 의 에너지가 방출되도록 UVB를 조사하였다. UVB 방출량 측정은 UVB Solarmeter (Mat SCIENCE TECH)를 이용하였다.

#### OVA항원 특이적 T 세포주 배양

생쥐(C57BL/6)를 OVA로 2차 면역한 후 비장을 분리하여 OVA에 특이적으로 증식반응을 나타내는 T 세포주를 수립하였고, 수립된 세포주는 유세포분석기로 분석하여  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^-$  T세포이며 항원자극에 대해 IL-2와 IFN- $\gamma$ 를 생산하는 Type 1 helper T 세포인 것을 확인하였고 HS-1으로 명명하였다. 수립된 HS-1 T 세포주는 24 well plate에서 배양하면서, 37°C에서 25분간 MMC (50  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하고 세포 배양액으로 1,200 rpm, 5분(4°C)간 3번 세척한 동종의 생쥐 비장세포  $5 \times 10^6$ 개와 OVA (1 mg/ml) 항원으로 2주에 한 번씩 활성화시켜 세포수를 늘려서 사용하였다. 그리고 이들에 한번씩 CAS (concanavalin A supernatant)가 10%가 되도록 첨가한 배지로 교환하면서 세포주를 유지하였다.

#### OVA항원 특이적 T 세포주 증식 측정

시료 전 처리의 경우에 5일간 배양한 수지상세포( $3 \times 10^4$ 개)에 HemoHIM을 농도별(1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하고 24시간 후 자외선(0~160  $\text{mJ/cm}^2$ )을 조사하고 동시에 OVA(1 mg/ml) 항원을 처리하였다. 다시 24시간 배양한 후 OVA에 특이적으로 반응하는 T세포주( $5 \times 10^4$ 개)를 첨가하여 3일간 배양한 후 T 세포주의 증식을 측정하였다. 시료 후 처리의 경우에 6일간 배양한 수지상세포( $3 \times 10^4$ 개)에 자외선(0~160  $\text{mJ/cm}^2$ )을 조사하고 HemoHIM을 농도별(1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하고 동시에 OVA(1 mg/ml)항원을 처리하였다. 다시 24시간 배양한 후 OVA에 특이적으로 반응하는 T세포주( $5 \times 10^4$ 개)를 첨가하여 다시 3일간 배양한 후 T세포주의 증식을 측정하였다. T세포주 증식은 Cell titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell proliferation Assay를 사용하여 측정하였다. 즉 배양액 100  $\mu\text{l}$ 에 cell titer 시약을 15  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 4~8시간 동안 배양한 다음

Microplate reader (OPTImax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### IL-2와 IFN- $\gamma$ 분비량 측정

자외선을 수지상세포에 조사하기 전과 후에 HemoHIM을 농도별(1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하고 OVA항원과 T세포주를 첨가하여 24시간 배양 한 후, 배양 상층액을 수거하여 상층액에 포함된 IL-2, IFN- $\gamma$ 의 양을 효소 항체법(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)를 이용하여 측정하였다. 즉, 일차항체 anti-IL-2, IFN- $\gamma$  mAb를 coating buffer (0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ )에 희석하여 plate에 적정량을 넣고 4°C에서 하룻밤 둔 다음 washing (0.05% Tween 20/PBS)으로 세척한 다음, 10% FCS를 첨가한 PBS로 2시간 동안 blocking하였다. 그리고 배양 상층액을 적절하게 희석하여 넣은 다음, 4시간 후에 washing용액으로 세척하고 이차 항체 biotin-conjugated anti-IL-2, IFN- $\gamma$  mAb를 첨가하였다. 1시간 후에 washing용액으로 세척한 다음, avidin-peroxidase를 첨가하고, 기질(2,2'-azino-bis, 0.1 M citric acid,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 넣어 발색시켜서 Microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 환산하였다. 이때 각 사이토키인의 측정 한계치는 10 pg/ml이었다.

#### DNCB 항원 처리 및 림프절 세포의 증식반응

DNCB (1-Chloro-2, 4-Dinitrobenzene, Sigma)를 사용직전에 만들어 합텐으로 사용하였으며 acetone과 olive oil을 4:1로 섞은 용액에 원하는 농도로 용해시켜 희석하였다. UVB 조사 2시간 후 DNCB 피부 감작을 위하여 노출된 복부에 0.25%, 0.5%, 1%, 3%, 7% DNCB를 100  $\mu\text{l}$ 씩 도포하였다. DNCB를 적정량 복부에 도포한 생쥐의 경부(목), 액와(겨드랑이), 서혜부(복부), 슬와(다리근육) 림프절을 자외선 조사 4일, 5일, 6일 후에 무균적으로 떼어낸 다음 핀셋을 이용하여 단일세포로 만들어 trypan blue로 염색하여 생세포 수를 혈구계산반으로 계산하여 사용하였다. 분리한 림프구 세포  $5 \times 10^5$ 개와 항원으로 DNBS (2, 4-Dinitrobenzen-sulfonic acid dihydrate)를 농도별(10, 30, 100, 300  $\mu\text{g/ml}$ )로 96 well microplate에 분주하고 3일간 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양한 후 림프구 세포의 증식을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### UVB 조사량 결정

세포성 면역반응은 T세포 의존적 면역반응으로 항원제시 세포(antigen presenting cells)가 MHC 분자에 결합한 항원을 제시하는 것으로 시작한다. B세포, 대식세포, 수지상세포가 항원을 제시하는 능력을 가진 세포이지만 불활성화 상태의 B세포는 탐식작용이 활발하지 못하고 MHC 분자의 발현양도 많

지 않다. 대식세포의 경우 탐식작용은 활발하지만, 면역작용의 결과 생산되는 IFN- $\gamma$ 와 같은 사이토카인의 도움이 없으면 MHC 분자를 발현하지 못하기 때문에 항원을 제시할 수 없다. 그러나 수지상세포(dendritic cells)는 생체 내에 널리 분포하고 있으며 성숙하는 과정에서 다양한 면역반응을 조절하는 강력한 전문 항원제시세포로 알려져 있다[1]. 이러한 수지상세포의 항원제시 기능을 억제시키는 자외선 조사량을 결정하기 위해 0~320 mJ/cm<sup>2</sup>의 자외선을 수지상세포에 직접 조사하고, OVA항원과 OVA항원에 특이적으로 반응하는 T 세포주(HS-1)와 반응시켜 T 세포주의 증식반응과 사이토카인(IL-2와 IFN- $\gamma$ ) 생산량을 측정하였다. 골수에서 분리한 세포에 IL-4와 GM-CSF를 첨가하여 분화시킨 수지상세포에 자외선을 조사한 다음, OVA항원을 첨가하고 24시간 배양한 후, T 세포주와 함께 다시 3일간 배양하여 T 세포주의 증식반응을 측정하였다. 그 결과 자외선 조사량에 비례하여 증식반응이 점차 감소하였고, 200 mJ/cm<sup>2</sup> 이상의 조사량에서는 완전히 억제되는 것으로 나타났다(Table 1). 그리고 수지상세포에 대한 자외선 조사량이 증가함에 따라 IL-2와 IFN- $\gamma$  생산량이 감소하는 것으로 나타났다. IL-2 생산은 200 mJ/cm<sup>2</sup> 이상의 조사량에서는 완전히 억제되는 것으로 나타났고, IFN- $\gamma$  생산량도 자외선 조사량이 증가할수록 급격히 감소하였으며, 160 mJ/cm<sup>2</sup> 이상의 조사량에서는 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 매우 적은 것으로 나타났다. 즉 자외선 조사량이 증가함에 따라 OVA항원을 포획하여 처리하는 수지상세포의 항원제시기능이 저하되어 T 세포주를 활성화시키지 못하는 것으로 생각된다. 따라서 T 세포 활성화를 억제하는 자외선 조사량을 160 mJ/cm<sup>2</sup> 이하로 결정하고 다음 실험을 수행하였다.

**HemoHIM 전처리의 방호효과**

자외선 조사로 억제된 수지상세포의 T 세포주 활성화 기능을 HemoHIM 전처리로 방호할 수 있는지 확인하기 위하여, 수지상세포에 자외선을 조사하기 24시간동안 HemoHIM을

농도별로 처리하고, 자외선 조사 후에 OVA항원과 T 세포주를 첨가하여 배양하였다. 그 결과 HemoHIM을 24시간동안 전처리하였을 때, 처리하지 않은 대조군에 비해 T 세포주의 증식반응이 증가한 것으로 나타났다(Table 2). 즉 120 또는 160 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사한 T 세포주 증식반응 0.60±0.00, 0.60±0.01에 비해, HemoHIM (100  $\mu$ g/ml)을 전처리하였을 때 0.69±0.01, 0.69±0.02로 유의하게 증가하였고, 40 또는 80 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사한 T 세포주 증식반응 0.65±0.00, 0.64±0.01에 비해, HemoHIM (10  $\mu$ g/ml)을 전처리하였을 때 0.75±0.02, 0.70±0.00로 자외선을 조사하지 않은 대조군의 증식반응 0.76±0.03과 비슷하게 나타났다. 자외선 조사량이 40에서 160 mJ/cm<sup>2</sup>로 증가함에 따라 T 세포주의 IL-2 생산량이 급격히 감소하였지만, HemoHIM을 전처리하였을 때 IL-2 생산량이 오히려 더 증가하였다(Table 2). 즉 120 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사한 대조군(164±5 pg/ml)에 비해 HemoHIM (100  $\mu$ g/ml)을 전처리한 실험군(904±27 pg/ml)에서 IL-2 생산량이 약 5.5배로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 자외선을 조사하지 않은 대조군의 IL-2 생산량(3,268±175)만큼은 증가하지 않았다. IFN- $\gamma$  생산량 역시 수지상세포에 대한 자외선 조사량이 증가함에 따라 감소하였지만, HemoHIM을 전처리하면 IFN- $\gamma$  분비량이 증가하였다. 즉 자외선 120 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사한 대조군(4.3±0.2 ng/ml)에 비해 HemoHIM (100  $\mu$ g/ml)을 전처리한 실험군(18.6±1.2 ng/ml)에서 IFN- $\gamma$  생산량이 약 4.3배로 증가하였다. 그러나 자외선을 조사하지 않은 대조군의 IFN- $\gamma$  분비량(149.5±6.6 ng/ml)만큼은 증가하지 않았다. 따라서 자외선 조사전에 HemoHIM을 처리하였을 경우에 자외선 조사에 의해 억제되는 수지상세포의 T 세포주 활성화 기능을 방호하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

**HemoHIM 후처리의 방호효과**

수지상세포에 자외선을 조사한 후 HemoHIM을 처리하여도 수지상세포의 항원제시기능에 대한 방호효과가 나타나는

Table 1. Effect of UVB radiation doses on the growth and cytokine production of OVA-specific T cell clone

UVB (mJ/cm <sup>2</sup> )	Growth (OD 490) <sup>1)</sup>	IL-2 (pg/ml) <sup>2)</sup>	IFN- $\gamma$ (ng/ml) <sup>2)</sup>
0	1.457±0.023	765.7±0.9	2,891.2±3.8
40	1.228±0.028	249.9±1.6	1,475.5±1.3
80	1.067±0.021	99.2±0.5	57.0±1.7
120	0.945±0.023	72.3±1.6	30.6±0.8
160	0.716±0.006	19.3±0.5	7.7±0.3
200	0.572±0.052	<10	2.7±0.1
240	0.633±0.006	<10	3.2±0.2
280	0.545±0.027	<10	1.4±0.0
320	0.516±0.015	<10	0.5±0.0

<sup>1)</sup>Day 6 DC were exposed to different doses of a single UVB radiation and were cultured with OVA (1 mg/ml) for 24 hr. HS-1 (5×10<sup>4</sup> cell/well) was stimulated with different doses of a single UVB irradiated Day 7 DC (3×10<sup>4</sup> cell/well) for 3 days.

<sup>2)</sup>Day 7 DC cocultured with HS-1 for 24 hr, and IL-2 and IFN- $\gamma$  levels in the supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean±SD for triplicates.

Table 2. Effect of HemoHIM pretreatment on the growth and cytokine production of OVA-specific T cell clone

	UVB (mJ/cm <sup>2</sup> )	HemoHIM (µg/ml)			
		0	1	10	100
Growth (OD 490) <sup>1)</sup>	0	0.76±0.03			
	40	0.65±0.00	0.63±0.02	0.75±0.02	0.66±0.04
	80	0.64±0.01	0.66±0.00	0.70±0.00	0.67±0.01
	120	0.60±0.00	0.63±0.01	0.64±0.01	0.69±0.01
	160	0.60±0.01	0.63±0.02	0.64±0.02	0.69±0.02
IL-2 (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	3,268±175			
	40	855±12	1,736±51	2,464±27	2,049±12
	80	348±4	677±37	689±28	1044±81
	120	164±5	209±0	184±3	904±27
	160	127±3	124±3	105±2	680±39
IFN-γ (ng/ml) <sup>2)</sup>	0	149.5±6.6			
	40	39.3±0.2	41.3±0.5	20.5±1.7	61.4±0.0
	80	14.9±0.9	20.4±1.0	13.8±0.2	39.8±0.2
	120	4.3±0.2	4.4±0.0	4.0±0.1	18.6±1.2
	160	3.7±0.0	3.2±0.1	2.3±0.0	11.8±1.0

<sup>1)</sup>Day 5 DC were stimulated with HemoHIM for 24 hr. After 24 hr, DC were exposed to different doses of a single UVB radiation and then cultured with OVA for 24 hr. Day 7 DC were cocultured with HS-1 for 3 days.

<sup>2)</sup>Day 7 DC cocultured with HS-1 for 24 hr, and IL-2 and IFN-γ levels in the supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean±SD for triplicates.

Table 3. Effect of HemoHIM posttreatment on the growth and cytokine production of OVA-specific T cell clone

	UVB (mJ/cm <sup>2</sup> )	HemoHIM (µg/ml)			
		0	1	10	100
Growth (OD 490) <sup>1)</sup>	0	1.02±0.04			
	40	0.82±0.02	0.68±0.02	0.69±0.02	0.62±0.04
	80	0.64±0.00	0.63±0.00	0.63±0.03	0.52±0.03
	120	0.63±0.03	0.65±0.01	0.65±0.01	0.52±0.01
	160	0.60±0.00	0.67±0.02	0.65±0.05	0.52±0.01
IL-2 (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	5,405±212			
	40	4,660±35	5,018±70.0	5,751±188	6,526±12.1
	80	2,785±94	2,185±0.0	2,326±35	2,385±47.0
	120	1,287±33	1,356±3.8	1,647±67	1,869±10.1
	160	840±131	798±4.0	807±33	1,056±12.3
IFN-γ (ng/ml) <sup>2)</sup>	0	378.2±15.5			
	40	399.2±7.0	346.2±5.6	398.2±11.3	354.2±0.0
	80	237.2±2.5	246.9±2.1	265.2±26.3	237.9±4.6
	120	124.2±10.0	133.6±5.3	132.1±10.6	126.9±3.1
	160	68.0±2.1	60.0±0.3	67.1±1.9	77.3±6.0

<sup>1)</sup>Day 6 DC were exposed to different doses of single UVB radiation. UVB irradiated DC were stimulated with HemoHIM and then cultured with OVA for 24 hr. Day 7 DC were cocultured with HS-1 for 3 days.

<sup>2)</sup>Day 7 DC cocultured with HS-1 for 24 hr, and IL-2 and IFN-γ levels in the supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean±SD for triplicates.

지를 확인하기 위해, 자외선 조사 후 HemoHIM을 농도별로 처리하여 24시간 배양하고, OVA항원과 T 세포주를 첨가하여 T 세포주 반응을 측정하였다. HemoHIM을 처리하지 않은 대조군에 비해 후처리하였을 때, T 세포주의 증식반응은 비슷하거나 오히려 약간 감소하는 것으로 나타나, 수지상세포에 자

외선을 조사하고 HemoHIM을 후처리하였을 경우에 T 세포주의 증식반응을 유의하게 회복시키지는 못하는 것으로 나타났다(Table 3). 그러나 T 세포주의 IL-2와 IFN-γ 생산량은 HemoHIM 후처리 농도에 따라 약간 증가하였다. 특히 자외선 40 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사한 대조군(4,660±5 pg/ml)에 비해 HemoHIM

(100 µg/ml)으로 후처리한 실험군(6,526±12 pg/ml)에서 T 세포의 IL-2 생산량이 약 1.4배로 증가하였다. 따라서 자외선 조사 후에 HemoHIM을 처리하였을 경우에도 자외선 조사에 의해 억제되는 수지상세포의 T 세포주 활성화 기능을 방호하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

수지상세포가 T 세포를 활성화시키는 것은, 포획한 항원을 분해하여 MHC 분자에 항원을 결합시켜 T세포 항원 수용체를 자극하는 신호와 수지상세포가 가진 세포 표면 단백질 분자로 T세포 표면 단백질을 자극하는 신호를 전달하는 것이다[1]. 따라서 자외선을 조사하기 전 후에 HemoHIM을 처리하였을 때, 수지상세포의 T 세포 활성화 기능이 회복된 것은 우선적으로 수지상세포 표면분자의 발현이 증가된 결과로 해석할 수 있다. 즉 본 연구자들의 이전 실험에서 HemoHIM을 첨가하여 수지상세포를 배양하였을 때, T세포의 세포표면 분자인 CD28, CD152, CD154와 결합하여 T세포를 활성화시킬 수 있는 CD40, CD86 (B7-2) 분자의 발현이 유의하게 증가한 것을 확인하였고[25], 그 외 *Agaricus blazei*의 물추출 성분[8]과 *Aloe vera*의 추출 성분[15], *Candida* β-D-glucan [7] 등이 세포표면 분자의 발현을 증가시킨다는 보고도 있었다.

이상의 실험 결과로, HemoHIM이 자외선 조사에 의해 억제된 수지상세포의 기능을 방호하는 효과가 있다는 것을 시험관내 실험(*in vitro*)으로 확인하였고, 이러한 결과가 생체내 실험(*in vivo*)에서도 적용되는지 알아보기 위하여 다음 실험을

진행하였다.

**DNCB항원의 농도 결정**

항원으로 사용하는 DNCB의 적정량을 결정하기 위하여, 농도별로 생쥐 복부에 바르고 5일 후에 림프절을 분리하여 림프구를 회수하고, 항원에 대한 T 세포의 반응을 측정하였다. DNCB에 대한 T 세포의 증식반응을 측정한 결과, 0.5% DNCB를 피부에 발랐을 때 가장 큰 증식반응(0.866±0.02)이 유도되었다(Table 4). 즉 분리한 림프구에 불용성인 DNCB 대신에 유사한 구조를 가지는 수용성 DNBS를 농도별로 첨가하고 3일간 배양하여 DNBS에 대해 증식하는 T 세포의 반응을 측정하였다. T 세포의 증식반응은 DNBS 농도에 의존적으로 증가하였고, 300 µg/ml에서 최대 증식반응이 나타났다. DNCB 0.5%일 때 DNBS(100 µg/ml)에 대한 IL-2 생산량(187.7±1.8 pg/ml)이 대조군(18.7±1.2 pg/ml)에 비해 약 10배정도 증가하였고, 0.25% DNCB에 대해서는 약 5.4배로 증가하였다(Table 5). IFN-γ 생산량도 DNCB 농도가 증가할수록 증가하였고, 7% DNCB일 때 DNBS (100 µg/ml)에 대해서 실험군(248.7±16.5 pg/ml)은 대조군(32.0±16.5 pg/ml)에 비해 약 7.8배 정도 증가하였다. 따라서 이 후 실험은 최대 T 세포 증식반응과 IL-2 생산량을 유도하는 DNCB 0.5% 농도를 사용하였다.

**DNCB항원 제시에 걸리는 시간 결정**

피하에 있는 항원전달세포인 Langerhans 세포가 DNCB를

Table 4. Effect of DNCB concentration on the growth of lymph node cells

DNBS (µg/ml)	DNCB concentration (%)				
	0.25	0.5	1	3	7
0	0.000±0.00	0.000±0.00	0.000±0.00	0.000± 0.00	0.000±0.00
10	0.073±0.01	0.254±0.00	0.219±0.02	0.334± 0.01	0.313±0.04
30	0.150±0.03	0.514±0.02	0.369±0.01	0.464± 0.01	0.437±0.00
100	0.226±0.01	0.805±0.01	0.579±0.03	0.662± 0.01	0.601±0.02
300	0.176±0.01	0.866±0.02	0.620±0.03	0.725± 0.04	0.652±0.02

The shaved abdominal skin of C57BL/6 mice was exposed to different concentrations of DNCB. Five days after sensitization, mice were sacrificed and then isolated with lymph nodes. Lymph node cells were stimulated with various concentrations of DNBS and then cultured for 3 days. Data are presented as mean±SD for triplicates.

Table 5. Effect of DNCB concentration on IL-2 and IFN-γ production of lymph node cells

DNCB (%)	IL-2 (pg/ml)		IFN-γ (pg/ml)	
	0	DNBS	0	DNBS
0.25	16.7±1.2	90.7±5.4	45.3±35.4	45.3±2.4
0.5	18.7±1.2	187.7±1.8	43.7±23.6	50.3±14.1
1	62.7±2.3	176.7±1.5	35.3±25.9	83.7±4.7
3	62.7±2.4	218.7±2.0	48.7±25.9	115.3±11.8
7	90.7±3.5	163.7±1.3	32.0±16.5	248.7±16.5

The shaved abdominal skin of C57BL/6 mice was exposed to different concentrations of DNCB. Five days after sensitization, mice were sacrificed and then isolated with lymph nodes. Lymph node cells were stimulated with DNBS (100 µg/ml) and then cultured for 24 hr. IL-2 and IFN-γ levels in the supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean±SD for triplicates.

인지하고 포획하여 림프절로 이동한 후에, DNCB를 T 세포에 전달하여 활성화시키는데 걸리는 시간을 측정하기 위해, 피부 도말 후 각각 4일, 5일, 6일에 림프구를 분리하여 T 세포의 반응을 측정하였다. 그 결과 0.5% DNCB를 피부에 바르고 4일 후에 림프절을 분리하였을 때, DNBS항원에 대해 가장 높은 T 세포의 증식반응(0.520±0.02)이 나타났다(Table 6). 이 때 증식반응은 DNBS 농도에 의존적으로 증가하였고, IL-2 생산량(252.75±5.30)은 DNBS 300 µg/ml일 때 6일 후에 가장 많았지만, IFN-γ 생산량(690.00±21.21)은 4일 후에 가장 많게 나타났다. 즉 0.5% DNCB를 피부에 바르고 4일 후에 DNBS에 대한 T 세포의 반응이 가장 높게 나타났다.

UVB 조사량 결정

항원전달세포인 Langerhans 세포가 T 세포의 반응을 최대 로 유도하는 조건에서, 100, 300, 1,000 mJ/cm<sup>2</sup>의 자외선을 조사하고 T 세포의 반응을 측정하였다. 그 결과 자외선 조사량이 증가함에 따라 DNBS에 대한 T 세포의 증식반응이 억제되었다(Table 7). 특히 1,000 mJ/cm<sup>2</sup> 자외선을 조사하였을 때는 T 세포의 증식반응이 거의 측정되지 않았고, 300 mJ/cm<sup>2</sup> 자외선을 조사한 경우에는 대조군에 비해 약 40% 정도 억제되는 것으로 나타났다. 또한 IL-2와 IFN-γ 생산량도 자외선을 조사하지 않은 대조군과 비교하였을 때 자외선 조사량이 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 이상의 실험 결과, 300 mJ/cm<sup>2</sup>의 자외선을 조사한 2시간 후에 0.5% DNCB를 피부에 바르고, 4일 후에 림프절을 분리하여 DNBS에 대한 T 세포의

반응을 관찰하였을 때, T 세포의 증식반응과 IL-2, IFN-γ의 생산량이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 동일한 조건에서 자외선에 의해 억제된 피부 Langerhans 세포의 항원 전달기능을 방호하는 HemoHIM의 효과를 확인하였다.

복강 투여한 HemoHIM의 효과

자외선을 조사하기 24시간 전과 조사 후 30분 이내에 HemoHIM (1 mg)을 생쥐 복강에 투여하고 자외선을 조사한 실험군의 T 세포 반응을 비교하였다. 그 결과 자외선을 조사하지 않은 음성 대조군에 비해 자외선만을 조사한 양성 대조군에서 T 세포의 증식반응이 유의하게 감소하였다(Table 8). 그러나 자외선 조사로 감소한 T 세포의 증식반응이 HemoHIM을 복강 투여한 실험군에서는 완전히 회복되었으며, 자외선을 조사하지 않은 음성 대조군에 비해 오히려 증가한 것으로 나타났다. IL-2와 IFN-γ 생산량도 양성 대조군에서 유의하게 감소하였으나, 실험군에서 유의하게 회복하였다. 이상의 실험 결과, 자외선 조사에 의해 저하된 피부 항원전달세포인 Langerhans 세포의 기능이 HemoHIM을 복강으로 투여하였을 때 완전히 회복되는 것으로 나타났다.

구강 투여한 HemoHIM의 효과

HemoHIM을 구강으로 투여를 하였을 때도 동일한 효과가 나타나는지를 알아보기 위하여 하루에 0.5~1 mg씩 3주 동안 섭취하도록 한 후 자외선을 조사하고 T 세포의 반응을 비교하였다. 자외선만을 조사한 양성 실험군에 비하여

Table 6. Growth and cytokines of lymph node cells after 0.5% DNCB sensitization

	DNBS (µg/ml)	after DNCB sensitization (days)		
		4	5	6
Growth (OD 490) <sup>1)</sup>	0	0.000±0.00	0.000±0.00	0.000±0.00
	10	0.279±0.00	0.143±0.01	0.069±0.01
	30	0.372±0.05	0.230±0.00	0.110±0.03
	100	0.513±0.03	0.442±0.00	0.228±0.00
	300	0.520±0.02	0.370±0.01	0.141±0.01
IL-2 (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	12.14±5.05	20.71±3.03	10.00±0.00
	10	60.00±2.02	41.43±2.02	19.63±6.19
	30	90.00±2.02	58.57±8.08	45.25±1.77
	100	121.43±2.02	115.00±1.01	107.13±6.16
	300	217.86±5.05	245.71±14.14	252.75±5.30
IFN-γ (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	40.40±21.21	23.00±3.54	17.50±10.61
	10	85.00±0.00	10.00±0.00	12.50±3.54
	30	185.00±7.07	10.00±0.00	47.50±3.54
	100	412.50±3.54	12.17±21.21	42.50±17.68
	300	690.00±21.21	18.83±4.71	47.50±17.68

<sup>1)</sup>The shaved abdominal skin of C57BL/6 mice was exposed to DNCB (0.5%). After sensitization for 4~6 days, mice were sacrificed and then isolated with lymph nodes. Lymph node cells were stimulated with various concentrations of DNBS and then cultured for 3 days.

<sup>2)</sup>Lymph node cells were stimulated with DNBS (0~300 µg/ml) and then cultured for 24 hr. IL-2 and IFN-γ levels in the supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean±SD for triplicates.

Table 7. Suppressive effect of UVB radiation on the growth and cytokine production of lymph node cells

	DNBS ( $\mu\text{g/ml}$ )	UVB ( $\text{mJ/cm}^2$ )			
		0	100	300	1,000
Growth (OD 490) <sup>1)</sup>	0	0.000±0.00	0.000±0.00	0.000±0.00	0.000±0.00
	10	0.134±0.009	0.100±0.009	0.007±0.012	0.005±0.002
	30	0.228±0.001	0.131±0.001	0.144±0.001	0.000±0.000
	100	0.355±0.002	0.293±0.006	0.209±0.006	0.008±0.036
	300	0.155±0.008	0.171±0.004	0.155±0.013	0.000±0.016
IL-2 (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	<10	<10	<10	<10
	10	59.50±1.77	37.63±4.42	10.13±0.88	0.00±2.65
	30	132.63±0.88	61.38±2.65	18.25±0.00	0.00±0.88
	100	170.75±1.77	110.75±3.54	56.38±0.88	18.25±10.61
	300	264.50±10.61	190.75±1.77	93.25±1.77	20.13±2.65
IFN- $\gamma$ (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	57.00±7.07	39.50±10.61	54.50±17.88	49.50±3.54
	10	39.50±24.75	59.50±3.54	29.50±3.54	54.50±10.61
	30	169.50±3.54	107.00±7.07	34.50±3.54	64.50±10.61
	100	219.50±10.61	157.00±7.07	114.50±3.54	47.00±0.00
	300	347.00±7.07	199.50±10.61	109.50±3.54	49.50±10.61

<sup>1)</sup>The shaved abdominal skin of C57BL/6 mice was exposed to different doses of a single UVB radiation or sham-radiation. Four days after DNCB (0.5%) sensitization, mice were sacrificed and then isolated with lymph nodes. Lymph node cells were stimulated with DNBS and then cultured for 3 days.

<sup>2)</sup>Lymph node cells were stimulated with DNBS and then cultured for 24 hr. IL-2 and IFN- $\gamma$  levels in the supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean±SD for triplicates.

Table 8. Protective effect of HemoHIM intraperitoneal administration on the growth and cytokine production of lymph node cells

	DNBS ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	UVB	UVB + HemoHIM
Growth (OD 490) <sup>1)</sup>	0	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
	10	0.241±0.005	0.232±0.014	0.335±0.035
	30	0.305±0.003	0.273±0.005	0.406±0.043
	100	0.436±0.017	0.379±0.011	0.520±0.026
	300	0.337±0.029	0.256±0.020	0.430±0.029
IL-2 (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	<10	<10	<10
	10	39.33±1.57	18.22±0.00	34.33±0.79
	30	55.44±0.79	31.56±0.00	63.78±0.00
	100	101.56±3.14	49.89±0.79	92.67±1.57
	300	164.89±1.57	82.67±1.57	206.00±6.29
IFN- $\gamma$ (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	27.67±4.71	<10	<10
	10	81.00±4.71	17.67±0.00	24.33±9.43
	30	109.33±2.36	9.33±2.36	281.00±0.00
	100	254.33±14.14	56.00±7.07	467.67±0.00
	300	299.33±7.07	52.67±7.07	102.67±2.36

<sup>1)</sup>The shaved abdominal skin of C57BL/6 mice was exposed to a single UVB radiation (300  $\text{mJ/cm}^2$ ) or sham-radiation. The irradiated skin was treated intraperitoneally 24 hours before and 30 min after irradiation with 1 mg of HemoHIM. Four days after radiation, mice were sacrificed and then isolated with lymph nodes. Lymph node cells were stimulated with DNBS and then cultured for 3 days.

<sup>2)</sup>Lymph node cells were stimulated with DNBS and then cultured for 24 hr. IL-2 and IFN- $\gamma$  levels in the supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean±SD for triplicates.

HemoHIM을 구강 투여한 다음 자외선을 조사한 실험군에서 항원에 대한 T 세포의 증식반응이 유의하게 증가하였고 음성 대조군보다 더 큰 증식반응이 나타났다(Table 9). 그리고 IL-2와 IFN- $\gamma$  생산량도 증식반응과 동일한 결과가 나타

났다. 이상의 실험 결과, 자외선 조사에 의해 저하된 피부 항원전달세포인 Langerhans 세포의 기능이 HemoHIM을 구강으로 투여하였을 때 완전히 회복되는 것으로 나타났다. 천연물에서 추출한 성분인 인삼 사포닌의 성분이 사람 단구



Table 9. Protective effect of HemoHIM oral administration on the growth and cytokine production of lymph node cells

	DNBS (μg/ml)	0	UVB	UVB + HemoHIM
Growth (OD 490) <sup>1)</sup>	0	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
	10	0.114±0.007	0.075±0.004	0.165±0.033
	30	0.169±0.001	0.071±0.001	0.336±0.003
	100	0.247±0.014	0.088±0.009	0.460±0.000
	300	0.120±0.007	0.049±0.003	0.436±0.024
IL-2 (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	11.86±2.02	<10	44.00±1.01
	10	101.86±0.00	70.43±2.02	95.43±13.13
	30	139.71±5.05	110.43±2.02	157.57±4.04
	100	251.14±1.01	156.86±5.05	294.00±1.01
	300	321.86±4.04	194.00±1.01	591.14±7.07
IFN-γ (pg/ml) <sup>2)</sup>	0	20.00±14.14	<10	105.00±7.07
	10	145.00±7.07	0.00±14.14	275.00±35.35
	30	285.00±7.07	15.00±21.21	685.00±32.34
	100	800.00±28.28	95.00±14.49	1,970.00±70.71
	300	1,005.00±21.21	35.00±7.07	2,490.00±56.56

<sup>1)</sup>The shaved abdominal skin of C57BL/6 mice was exposed to a single UVB radiation (300 mJ/cm<sup>2</sup>) or sham-radiation. Mice were fed a HemoHIM-containing drinking water during 3 weeks before radiation. Four days after radiation, mice were sacrificed and then isolated with lymph nodes. Lymph node cells were stimulated with DNBS and then cultured for 3 days.

<sup>2)</sup>Lymph node cells were stimulated with DNBS and then cultured for 24 hr. IL-2 and IFN-γ levels in the supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean±SD for triplicates.

세포에서 분화한 수지상세포의 IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10 분비량을 증가시킨다는 보고[27], *Agaricus blazei*의 물추출 성분이 IL-2 분비량을 증가시키는 결과[8], 보충익기탕 추출물[18]과 인삼 사포닌의 성분[27]에 의해 사람 단구세포에서 분화한 수지상세포가 동종항원 반응 T 세포의 증식반응을 증가시킨다는 것을 보고 등을 고려할 때, 이와 같이 복강 또는 구강으로 투여한 HemoHIM이 자외선에 의해 억제된 피부 Langerhans 세포의 기능을 회복시키는 효과는, 투여한 HemoHIM이 다양한 면역반응을 매개함으로써 나타나는 결과로 생각된다.

본 연구는 방사선 취급자 또는 암치료 과정에서 방사선에 노출된 환자를 위한 기능성식품 개발을 위한 원료로 개발한 HemoHIM을 이용하여 자외선으로 인하여 저하된 피부 면역 기능을 방호 또는 개선을 위한 새로운 가능성을 제시한 결과로 생각되며, 특히 수지상세포를 이용한 시험관 내 실험과 동물실험에서 자외선에 의한 피부 면역세포의 저하된 각종 기능을 보호하는 탁월한 효과를 가지는 것으로 나타나, 사람을 대상으로 하는 임상실험에 적용하여 그 효과를 증명할 수 있는 가능성이 높다고 생각한다. 그리고 기존의 자외선 차단제나 화장품에 첨가함으로써 새로운 기능성 화장품으로의 개발 가능성도 충분하다고 생각한다.

### 감사의 글

본 연구는 교육과학기술부의 원자력연구개발사업의 지원을 받아 수행하였기에 이에 감사드립니다.

### References

- Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **19**, 245-52.
- Berneburg, M., H. Plettenberg and J. Krutmann. 2000. Photoaging of human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed* **16**, 239-244.
- Clydesdale, G. J., G. W. Dandie, and H. K. Muller. 2001. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* **79**, 547-568.
- Jo, S. K., H. R. Park, U. H. Jung, H. Oh, S. H. Kim, and S. E. Lee. 2005. Protective effect of a herbal preparation (HemoHIM) on the self-renewal tissues and immune system against γ-Irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 805-813.
- Jo, S. K., Y. B. Yu, H. Oh, S. R. Kim, and S. H. Kim. 2000. The effects of Shi-Quan-Dai-Bu-Tang and its ingredients on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 93-98.
- Kasahara, S., K. Aizawa, M. Okamiya, N. Kazuno, S. Mutoh, H. Fugo, E. L. Cooper, and H. Wago. 2001. UVB irradiation suppresses cytokine production and innate cellular immune functions in mice. *Cytokine* **14**, 104-111.
- Kikuchi, T., N. Ohno, and T. Ohno. 2002. Maturation of dendritic cells induced by Candida beta-D-glucan. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 1503-1508.
- Kim, G. Y., M. Y. Lee, H. J. Lee, D. O. Moon, C. M. Lee, C. Y. Jin, Y. H. Choi, Y. K. Jeong, K. T. Chung, J. Y. Lee, I. H. Choi, and Y. M. Park. 2005. Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int.*

- Immunopharmacol.* **5**, 1523-1532.
9. Kim, S. H., H. Oh, E. S. Lee, S. K. Jo, and M. W. Byun. 1998. Effect of Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 888-894.
  10. Kim, S. H., H. Oh, S. R. Kim, S. K. Jo, M. W. Byun, K. S. Kim, J. H. Lee, and D. H. Shin. 2001. The radioprotective effects of radices herbs. *Korea J. Vet. Res.* **41**, 105-111.
  11. Kim, S. H., M. R. An, S. Y. Nah, J. H. Lee, J. H. Kim, S. K. Jo, S. J. Jang, and D. H. Shin. 2001. The effects of herbs on the radiation-induced apoptosis in intestinal crypt cells. *J. Korean Assoc. Radiat. Prot.* **26**, 27-33.
  12. Kim, S. H., S. E. Lee, H. Oh, J. A. Yang, C. Y. Chung, J. S. Jang, Y. B. Yu, and S. K. Jo. 1999. The radioprotective effect of Kuei-Pi-Tang as a prescription of traditional Chinese medicine in mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 698-704.
  13. Kim, S. H., S. E. Lee, H. Oh, S. R. Kim, S. T. Yee, Y. B. Yu, M. W. Byun, and S. K. Jo. 2002. The radioprotective effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang: A prescription of traditional Chinese medicine. *Am. J. Chin. Med.* **30**, 127-137.
  14. Kotera, Y., K. Shimizu, and J. J. Mulé. 2001. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res.* **61**, 8105-8109.
  15. Lee, J. K., M. K. Lee, Y. P. Yun, Y. S. Kim, J. S. Kim, Y. S. Kim, K. J. Kim, S. S. Han, and C. K. Lee. 2001. Acemannan purified from *Alce vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1275-1284.
  16. Lee, S. E., H. Oh, J. A. Yang, S. K. Jo, M. W. Byun, S. T. Yee, and S. H. Kim. 1999. Radioprotective effects of two traditional Chinese medicine prescriptions: Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang. *Am. J. Chin. Med.* **27**, 387-396.
  17. Lew, W. 2002. Immunologic mechanism of experimental and therapeutic ultraviolet B response. *Immune network* **2**, 65-71.
  18. Nabeshima, S., M. Murata, M. Hamada, Y. Chong, K. Yamaji, and J. Hayashi. 2004. Maturation of monocyte-derived dendritic cells by Hochu-ekki-to, a traditional Japanese herbal medicine. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 37-45.
  19. Oh, H., H. R. Park, I. Y. Jeong, S. H. Kim, and S. K. Jo. 2002. Protective effects of *Paeonia japonica* against radiation-induced damage. *J. Korean Assoc. Radiat. Prot.* **27**, 181-188.
  20. Park, H. R., E. J. Ju, S. K. Jo, U. Jung, S. H. Kim, and S. T. Yee. 2009. Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with HemoHIM in tumor-bearing mice. *BMC Cancer* **9**, 1-10.
  21. Park, H. R., S. H. Kim, S. T. Yee, M. W. Byun, and S. K. Jo. 2005. Effects of a herb mixture (HIM-I) on the protection of the hematopoietic-immune system and self-renewal tissues against radiation damage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 605-612.
  22. Rattis, F. M., M. Concha, C. Dalbiez-Gauthier, P. Courtellemont, D. Schmitt, and J. Péguet-Navarro. Effects of Ultraviolet B Radiation on human langerhans cells: Functional alteration of CD86 Upregulation and induction of apoptotic cell death. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 373-379.
  23. Reeve, V. E. 2002. Ultraviolet radiation and the contact hypersensitivity reaction in mice. *Methods* **28**, 20-24.
  24. Ryoo, Y. W., S. I. Suh, K. C. Mun, B. C. Kim, and K. S. Lee. 2001. The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* **27**, 162-169.
  25. Shin, S. H., D. S. Kim, S. H. Kim, S. K. Jo, M. W. Byun, and S. T. Yee. Effect of a Herbal composition (HemoHIM) on the Activation of Dendritic Cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1322-1328
  26. Takashima, A. 1995. UVB-dependent modulation of epidermal cytokine network: roles in UVB-induced depletion of langerhans cells and dendritic epidermal T cells. *J. Dermatol.* **22**, 876-887.
  27. Takei, M., E. Tachikawa, H. Hasegawa, and J. J. Lee. 2004. Dendritic cells maturation promoted by M1 and M4, end products of steroidal ginseng saponins metabolized in digestive tracts, drive a potent Th1 polarization. *Biochem Pharmacol.* **68**, 441-452.
  28. Tjioe, M., T. Smits, P. C. van de kerkhof, and M. J. Gerritsen. 2003. The differential effect of broad band vs. narrow band UVB with respect to photodamage and cutaneous inflammation. *Exp. Dermatol.* **12**, 729-733.
  29. Ullrich, S. E. and D. A. Schmitt. 2000. The role of cytokines in UV-induced systemic immune suppression. *J. Dermatol. Sci.* **23**, S10-S12.
  30. Wei, H., Q. Ca, R. Rahn, X. Zhang, Y. Wang, and M. Lebwahl. 1998. DNA structural integrity and base composition affect ultraviolet light-induced oxidative DNA damage. *Biochemistry* **37**, 6485-6490.

초록 : 생약복합조성물(HemoHIM)의 자외선 조사로 억제된 랑게르한스 세포의 항원제시기능 방호효과

김종진<sup>1</sup> · 조성기<sup>2</sup> · 정우희<sup>2</sup> · 박혜란<sup>2</sup> · 이성태<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>순천대학교 생명산업과학대학 생물학과, <sup>2</sup>한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소 방사선생명공학연구부)

방사선 조사에 대한 방호 효과와 방사선 치료에 의한 부작용 경감 효과를 가지는 새로운 생약복합조성물(HemoHIM)의 자외선 조사에 의한 피부 면역계 방호 효과에 대해 알아보았다. IL-4와 GM-CSF로 분화시킨 수지상세포에 자외선을 직접 조사하여 항원전달기능의 감소를 유발하는 자외선 조사 조건을 확립하고, HemoHIM을 자외선 조사 전 후에 처리하여 자외선에 의해 감소한 수지상세포의 항원전달기능이 회복되는 것을 확인하였다. 그리고 접촉성 과민반응 모델을 이용하여 피부의 Langerhans 세포의 항원전달기능의 감소를 유발하는 자외선 조사 조건을 확립하고, Langerhans 세포의 항원전달기능의 감소를 유발하고 HemoHIM을 각각 복강 또는 경구로 투여하는 방법으로 처리하였을 때, 억제된 Langerhans 세포의 항원전달 기능을 회복시키는 효과가 있다는 것을 확인하였다. 이상의 결과로 HemoHIM은 자외선 조사로 저하된 피부 면역 기능을 회복시키는 효과가 있다는 것을 증명하였고, 피부 면역 기능을 개선하는 새로운 자외선 차단제 개발을 위한 소재로 사용할 가능성을 제시하였다.