J Korean Soc Food Sci Nutr
41(11), 1521~1527(2012)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.11.1521

생약 추출물의 RAW 264.7 세포를 이용한 면역증강 효과

유아름 · 박호영 · 최인욱 · 박용곤 · 홍희도 · 최희돈†

한국식품연구원

Immune Enhancing Effect of Medicinal Herb Extracts on a RAW 264.7 Macrophage Cell Line

A-Reum Yu, Ho-Young Park, In-Wook Choi, Yong-Kon Park, Hee-Do Hong, and Hee-Don Choi†

Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

Abstract

Medicinal herbs have long been used as a remedy for diverse diseases in Asia owing to their various pharmacological effect. In this study, the immuno-enhancing activity of medicinal herbs was investigated using macrophage cell lines. Specifically, we examined the effects of extracts of twelve medicinal herbs on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells, and selected five that were highly effective (*Glycyrrhiza glabra*, *Rehmannia glutinosa*, *Angelica gigas*, *Platycodon grandflorum*, and *Actinidia polygama*) for further immune related studies. The effects of extracts from five theses medicinal herbs, which were mainly composed of polysaccharides and proteins on the production of immune-related cytokines in the RAW 264.7 macrophage cell line and the Molt-4 T cell line were investigated. The extracts of all investigated medicinal herbs increased the production of NO and cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-1beta (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10). Additionally, they slightly increased the proliferation of T-cells when compared to the control. Overall, the result of this study suggests that the five medicinal herb extracts investigated herein are useful natural immune enhancing agents.

Key words: medicinal herb, immunity, RAW 264.7 cell, nitric oxide, cytokine

서 론

생약재는 오랜기간 동안 아시아에서 많은 질병 치료에 효과적으로 사용되어 왔으며, 이후에는 잘 알려지고 기호도를 충족시킬 수 있는 생약재의 일부를 차류로서 이용해오고 있다. 현재 많은 생약재가 가공식품의 원료로 이용되고 있으며, 대부분이 질병의 치유보다는 건강 유지 또는 자양강장을 목적으로 섭취하는 경우가 많다. 생약재 내의 유효한 성분은 인체의 면역 시스템 중 보체계(complement system)의 활성화, 면역 관련 cytokine의 활성화 등의 질병에 대한 생체방어 시스템을 보강하는 등 인체의 생체 항상성(homeostasis)에 큰 영향을 미친다(1).

면역이란 인체가 미생물에 의한 침입 과정에서 스스로를 지키기 위한 일종의 보호기작으로서 조직, 세포, 분자들이 감염원에 대하여 기관을 보호하는 것이다. 면역 감시 체계는 크게 선천적 면역계(innate immunosurveillance)와 획득 면역계(adaptive immunosurveillance)로 분류된다. 선천적 면역계는 대식세포 및 자연 살해 세포(natural killer cell) 등을 포함하는 백혈구, cytokine 등으로 구성되어 있어 감염에 대한 적응 면역이 발생하기 전에 신속하게 반응하여 1차 방어 역할을 한다(2). 선천 면역계에서 생체 방어 기구의 최전선을 담당하는 대식세포는 숙주의 방어기구의 일부로서 면역계에 매우 중요한 역할을 수행하여 외부물질 침입을 가장 먼저 인지하여 체액성 면역과 세포성 면역에 관여하며 대식세포가 활성화되면 증식과 확산능력의 향상 등과 같은 세포의 형태적 변화뿐만 아니라 대식능력의 증강, nitric oxide (NO) 및 cytokine 생성의 향상을 수반하여 종국적으로 암세포와 각종 유해균의 성장을 억제시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 최근에는 이러한 면역 작용을 천연물질로 증진시키려는 연구에 대한 관심이 부각되고 있으며, 특히 천연물질로부터 유래된 면역 증강제는 면역 반응을 강화시키거나 저하된 면역능을 원상회복시킬 수 있을 것으로 기대하고 있다(3).

본 연구에서는 12가지 생약추출물 중 NO 생성능이 높은 5가지 생약재를 선별한 후 이들의 면역 관련 활성 능력을 알아보았다. 생약추출물을 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 처리한 다음 대식세포가 생성하는 NO 및 이와 관련된 cytokine들인 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-1beta(IL-1β), interleukin-6(IL-6), interleukin-10

†Corresponding author. E-mail: chdon@kfri.re.kr
Phone: 82-31-780-9068, Fax: 82-31-709-9876

(IL-10)의 생성량을 측정하였고, T세포주인 Molt-4 세포에 처리하여 면역세포 증식능을 확인하여 생약추출물의 면역증진 기능성식품 소재로서 응용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출물 제조

본 연구에 사용한 생약재, 즉 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*), 우슬(*Achyranthes japonica*), 목천료(*Actinidia polygama*), 당귀(*Angelica gigas*), 인진쑥(*Artemisia capillaris*), 천궁(*Cnidium officinale*), 산약(*Disocorea batatas*), 감초(*Glycyrrhiza glabra*), 어성초(*Houttuynia cordata*), 송엽(*Lampranthus spectabilis*), 도라지(*Platycodon grandiflorum*), 지황(*Rehmannia glutinosa*) 등은 2011년 10월 경동시장에서 구입하였다. Bae 등의 방법(4)에 따라 *n*-hexane을 이용하여 탈지한 건조분말 생약재 50 g을 1 L의 20 mM tris-HCl buffer(pH 8.0)에 용해하고 polyvinylpyrrolidone 5 g을 첨가하여 10°C에서 16시간 교반 후 원심분리 하였다. 상등액을 여과하여 불순물을 제거하고, 80% ammonium sulfate로 4시간 동안 처리한 후 원심분리 하여 얻은 pellet은 20 mM tris-HCl buffer(pH 7.4)에 녹여 투석막(spectra/por dialysis membrane, MWCO: 6,000~8,000, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)을 이용하여 10°C에서 48시간 동안 투석하였다. 투석된 용액은 동결건조 하였고, 얻어진 추출 건조분말은 -20°C 이하에 보관하면서 실험에 사용하였다.

단백질 정량

생약추출물내 단백질 함량은 Bicincchoninic acid protein assay kit(BCA, Thermo, Rockford, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. Bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 각각의 시료 25 µL를 96 well plate에 분주하고 BCA assay reagent 200 µL를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총당 함량

총당 함량 분석은 phenol-sulfuric acid법(5)으로 실시하였다. 0.2 mL의 5% phenol과 1 mL의 sulfuric acid를 시료 0.2 mL(1 mg/mL)와 혼합 후 실온에서 20분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose를 표준당으로 하여 총당 함량을 계산하였다.

세포 배양

실험에 사용한 대식세포주인 RAW 264.7(KTCC No.40071) 세포와 T세포주인 Molt-4(KTCC No.21582) 세포는 한국세포주은행(KTCC, Seoul)에서 분양받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS를 함유한 DMEM 배지를 이용하였고, Molt-4 세포는 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2로 조절된 incubator에서 배양하였다.

세포 독성

생약추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성 측정은 생존세포의 효소작용에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 이용하는 방법(6)으로 측정하였다.

NO 생성량

생약재의 면역 증강능력을 확인하기 위하여 microplate assay를 이용하여 RAW 264.7 세포의 배양 상등액 중의 NO_2^-의 생성 농도를 정량함으로써 측정하였다. 즉, RAW 264.7 세포를 2×10^5 cell/well의 농도로 96 well plate에 분주 24시간 후 생약추출물을 12, 25 µg/mL로 처리하고, 양성대조군으로는 1 µg/mL의 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 24시간 배양하였다. 상등액 100 µL와 동량의 Griess reagent를 혼합하여 상온에서 15분 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선의 작성은 sodium nitrite를 이용하였다.

Cytokine 생성량

Cytokine인 TNF-α와 IL-1β, IL-6, IL-10의 생성량 측정은 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^5 cell/well의 농도로 분주 24시간 후 생약추출물을 12, 25 µg/mL로 처리하고, 24시간 배양 후 세포의 상층액을 모아서 각각의 ELISA kit(Enzo Inc., Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 측정하였다(7). 측정방법은 단일클론항체가 코팅된 microtiter plate에 시료를 넣은 다음 실온에서 반응시킨 후 제공된 washing buffer로 세척하였다. 이어 다중클론성 항체를 넣어 각각의 cytokine을 plate에 부착시킨 후 실온에서 반응시키고 세척 후 측정하고자 하는 cytokine의 conjugate 용액을 넣고 반응시켰다. 반응시킨 plate를 washing buffer로 다시 세척하고 substrate solution으로 실온에서 발색시킨 다음 stop solution을 넣어 발색반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

T세포 증식

생약추출물의 T세포에 대한 증식능을 확인하기 위하여 Molt-4 세포를 96 well plate에 1×10^5 cell/well 농도로 분주 후 양성대조군으로 concanavalin A(Con A) 5 µg/mL와 생약추출물을 12, 25 µg/mL로 각각 처리한 후 96시간 배양하여 MTT assay를 실시하였다(8). 배양 후 0.5 mg/mL 농도의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 넣고, 빛을 차단한 상태에서 4시간 동안 37°C incubator에서 반응시킨 후 DMSO로 형성된 formazan을 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식능은 생약재 대신 동량의 배지를 넣은 대조군의 흡광도 대비 상대적인 값으로 나타내었다.

통계

본 실험에서 측정한 분석결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험군간의 통계학적 분석은 analysis of var-

Table 1. Effect of twelve medicinal herb extracts on nitric oxide production by RAW 264.7 cells

Sample	Nitric oxide (μM)
Con	0.6±0.1[j]
LPS	37.1±0.5[c]
Acanthopanax senticosus	1.9±0.2[j]
Achyranthes japonica	5.3±0.1[g]
Actinidia polygama	38.5±0.2[b]
Angelica gigas	37.4±0.9[c]
Artemisia capillaris	6.1±0.2[f]
Cnidium officinale	2.5±0.2[i]
Disocorea batatas	1.2±0.1[k]
Glycyrrhiza glabra	33.9±0.2[e]
Houttuynia cordata	0.9±0.1[k]
Lampranthus spectabilis	3.5±0.1[h]
Platycodon grandiflorum	35.5±0.2[d]
Rehmannia glutinosa	39.3±0.6[a]

Each value represents mean±SD. Values with the different letters are significantly different by one-way ANOVA test ($p<0.05$).

iance(ANOVA) 분석을 실시하였고, Duncan's multiple range test로 $p<0.05$의 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

대식세포 활성능

대식세포를 활성화시키는 면역 증강 소재를 선정하기 위하여 감초, 건지황 등 12종의 생약재를 RAW 264.7 세포에 처리 후 NO 생성량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 12가지 생약재 중 NO 생성능이 가장 높게 나타난 5종의 생약재는 감초, 건지황, 당귀, 도라지, 목천료 추출물로 각각 33.9, 39.3, 37.4, 35.5, 38.5 μM의 NO를 생성하였고, 이는 다른 생약재와 비교하였을 때 대식세포를 활성화시켜 cytokine 등의 생성을 증가시켜 면역 반응을 증진시킬 가능성이 있는 것으로 사료되어 5종의 생약재를 선별한 후 면역관련 지표를 분석하였다. 면역반응에서 대식세포는 체내면역을 극대화시키는 중요 매개체로 활성화되면 다양한 cytokine과 NO 등 생리활성물질을 분비하여 암세포에 대한 독성을 나타내는 대표적 물질들로 알려져 있다(9,10).

추출 수율, 단백질 및 총당 함량

생약재 5종의 추출 수율, 단백질과 당 함량은 Table 2에 나타내었다. 감초, 건지황, 당귀, 도라지, 목천료의 추출 수율은 각각 1.2, 0.7, 1.2, 1.5, 0.8%로 나타났다. 단백질 함량은 목천료가 65.6%로 가장 높았고, 당귀(21.5%), 감초(20.2%), 건지황(9.9%), 도라지(0.8%) 순으로 나타났고, 총당 함량은 건지황이 80.5%로 가장 높았고, 당귀(65.9%), 도라지(40.5%), 감초(37.9%), 목천료(20.1%) 순으로 나타났다. 생약재에는 alkaloids, flavonoids 및 terpenoids와 같은 저분자 물질과 다당류, 단백질, tannin 등과 같은 고분자 물질이 다양하게 혼재되어 있는 것으로 볼 때(3), 본 연구의 생약추출물에는 고분자인 단백질과 다당이 대부분을 차지하고 있는 것으로 판단된다. Aranha 등(11)의 연구에서 guduchi 줄기에서 추출한 단백질을 대식세포에 처리 시 NO가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다고 보고하였고, Yu 등(12)의 연구에서는 영지버섯에서 추출한 다당을 RAW 264.7 세포에 처리 시 TNF-α, IL-1β의 생성이 농도의존적으로 증가하였다고 보고하였다. 또한 Han 등(13)의 연구에서 영지버섯 추출물은 6.8%의 단백질과 결합한 다당으로 구성되어 있고, 대식세포에 농도별로 처리 시 농도의존적으로 TNF-α, IL-6의 cytokine의 생성이 증가하였다고 보고하였고, Kim 등(14)의 연구에서는 상황버섯 추출물은 당과 단백질 함량이 각각 73%, 16%로 이루어진 당과 단백질의 결합물로 대식세포에 처리하였을 때 IL-1β, IL-6 등의 cytokine이 대조군에 비해 3.8배 이상 증가하였다고 보고하였다. 이와 같이 단백질과 당은 단일로 존재하거나 서로 결합된 형태일 때 모두 대식세포를 자극하여 cytokine 생성을 증가시켜 면역 증강에 효과가 있다는 결과와 같이, 본 연구에서도 5종의 생약추출물은 고분자 물질인 당과 단백질의 함량이 건지황, 당귀, 목천료의 경우 85% 이상, 감초, 도라지의 경우 41% 이상 함유되어 있어 대식세포를 활성화시켜 면역 증강에 영향을 줄 것으로 생각된다.

Table 2. Extraction yield and contents of total protein and sugar of five medicinal herb extracts (%)

Sample	Yield	Content	
		Total protein	Total carbohydrate
Glycyrrhiza glabra	1.2	20.2	37.9
Rehmannia glutinosa	0.7	9.9	80.5
Angelica gigas	1.2	21.5	65.9
Platycodon grandiflorum	1.5	0.8	40.5
Actinidia polygama	0.8	65.6	20.1

세포 독성

생약추출물의 세포 독성 여부를 확인하기 위하여 미토콘드리아의 활성을 이용한 MTT assay를 이용하여 세포 독성능을 측정하였고, 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 5종의 생약추출물은 12, 25 μg/mL의 농도에서 모두 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 세포 독성에 큰 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

NO 생성능

대식세포에서 생성되는 NO는 면역계에서 종양세포나 세포내 감염된 미생물에 대한 방어작용을 하는 중요한 신호전달 물질로, nitric oxide synthetase의 작용에 의해 L-arginine이 L-citruline으로 변화되는 과정에서 생성되어 비특이적 숙주방어기작 대식작용, 세균 및 암세포의 증식억제 활성이 증명된 바 있다(3). 본 연구에서는 5종의 생약재를 12, 25 μg/mL의 농도로 대식세포에 처리 시 농도 증가에 따라 NO 생성이 증가되었으며, 특히 25 μg/mL 농도의 경우 대식세포

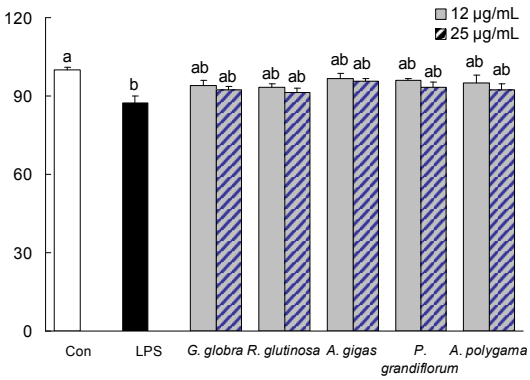

Fig. 1. Effect of medicinal herb extracts on the cell viability of RAW 264.7 macrophage. Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one-way ANOVA test ($p<0.05$).

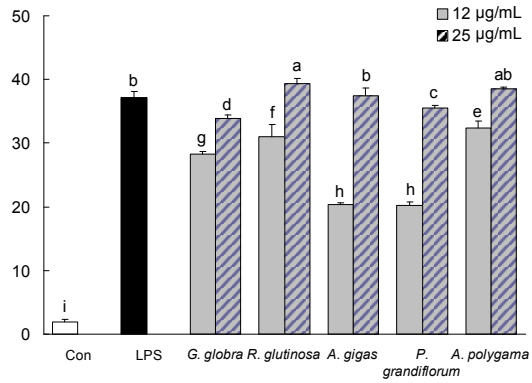

Fig. 2. Effect of medicinal herb extracts on the nitric oxide production by RAW 264.7 macrophage. Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one-way ANOVA test ($p<0.05$).

에서 NO 생성을 유도하는 물질인 LPS를 1 μg/mL 처리하였을 때 생성된 NO 함량과 비슷한 수준으로 생성되었다(Fig. 2). 이는 Lee 등(15)의 연구와 Shin 등(16)의 보고에서 독활, 참죽나무잎 추출물을 대식세포에 처리한 결과, NO 생성량이 추출물의 농도가 증가함에 따라 증가하였다는 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 대식세포는 숙주의 방어기구의 일부로서 면역계에 매우 중요한 역할을 수행하여 외부물질 침입을 가장 먼저 인지하여 대식세포가 활성화되면 대식능력의 증강, NO 및 cytokine 생성의 향상을 수반하여 종국적으로 암세포와 각종 유해균의 성장을 억제시킬 수 있는 것으로 여겨진다(3). 따라서 감초, 건지황, 당귀, 도라지, 목천료 5종의 생약추출물은 대식세포를 스스로 활성화시킴으로써 NO 생성을 증가시켜 외부 항원으로부터 자극받지 않아도 체내에서 면역반응이 일어나는 초기에 생체 방어에 유리한 작용을 해서 면역 기능을 높일 것으로 생각된다.

TNF-α 생성능

대식세포는 활성화되면 IL-1β, IL-6, TNF-α 등을 분비하여 면역반응을 조절한다. TNF-α는 T림프구와 상호 작용하여 T림프구의 활성과 성장 등을 조절하며 암세포의 세포용해를 유도함으로써 직접적으로 항암 작용을 나타내기도 한다. 반면 TNF-α가 지나치게 다량 분비되면 염증 및 면역반응에 관여하여 병의 상태를 더욱 악화시키는 원인이 되기도 한다. 따라서 식품과 관련된 연구에서는 양성대조군인 LPS 증가 수준의 상승을 지표로 보고 있다(17). 본 연구 결과 LPS를 처리한 경우 대조군에 비하여 유의적으로 높은 TNF-α를 생성하였으며, 5종의 생약추출물을 12, 25 μg/mL의 농도로 처리한 경우 농도 의존적으로 TNF-α의 생성이 증가하였으며(Fig. 3A), 특히 목천료의 경우 낮은 농도에서도 양성대조군인 LPS를 처리한 것과 비슷한 수준으로 생성하였다. 5종의 생약추출물은 LPS 수준으로 대식세포를 활성화시켜 TNF-α 생성 증가로 인해 미성숙 수지상세포(dendritic cell)의 표면에 단백질 혹은 보조자극인자(co-stimulatory molecule)의 발현을 촉진하여 성숙된 형태의 수지상세포로 전환시켜 T림프구와 상호 작용하여 T림프구의 활성과 동시에 T세포의 증식을 유도하는데 도움을 줄 수 있었던 것으로 보인다(2). 이는 Kim과 Kang(3)의 연구에서 생약복합물의 TNF-α 생성량을 조사한 결과 대조군에 비해 생약복합물의 첨가가 유의적으로 높았다는 보고와 Kounsar 등(18)의 연구에서 마디풀과 추출물을 대식세포에 처리한 결과 TNF-α의 생성이 대조군보다 많고 농도 의존적으로 생성되었다는 보고, Jeong 등(19)의 연구에서 Allergina herb를 농도별로 처리 시 대식세포를 자극하여 TNF-α를 생성하였다고 한 보고 등과 일치하였다. 생약추출물의 면역 증강 효과를 확인하기 위해서는 생약재로 자극한 대식세포에 의해 TNF-α 외에 더 다양한 종류의 cytokine 분비를 알아보기 위하여 IL-1β, IL-6, IL-10을 측정하여 확인하였다.

IL-1β 생성능

IL-1β는 단핵백혈구(monocyte)와 대식세포계 세포에 의해 생산되는 cytokine으로서 T세포를 활성화시키고, T세포에서 분비되는 IL-2와 같은 cytokine의 활성을 증진시키는 등 cytokine network에 중요한 역할을 한다(20). 본 연구 결과 5종의 생약재 모두 12 μg/mL의 낮은 농도에서도 대조군에 비해 유의적으로 높은 IL-1β를 생성하였으며, 양성 대조군인 LPS를 처리한 것보다도 높은 IL-1β가 생성되었고, 농도의존적으로 증가하였다(Fig. 3B). Bachiega와 Sforcin(21)의 연구에서 lemongrass 추출물을 macrophage에 처리한 결과 낮은 농도인 5, 10 μg/mL에서는 IL-1β의 생성량이 증가하였으나 25, 50, 100 μg/mL의 농도에서는 IL-1β 생성에 영향을 주지 않았다고 보고한 것과는 달리, 본 실험에서는 생약추출물을 처리하였을 때 모든 농도에서 IL-1β가 생성된 것으로 볼 때 5종의 생약재가 농도의존적으로 체내의 면역세포인 대식세포를 활성화시켜 IL-1β의 생성 증가에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

IL-6 생성능

IL-6는 면역반응, 조혈작용과 염증을 조절하는데 관여하

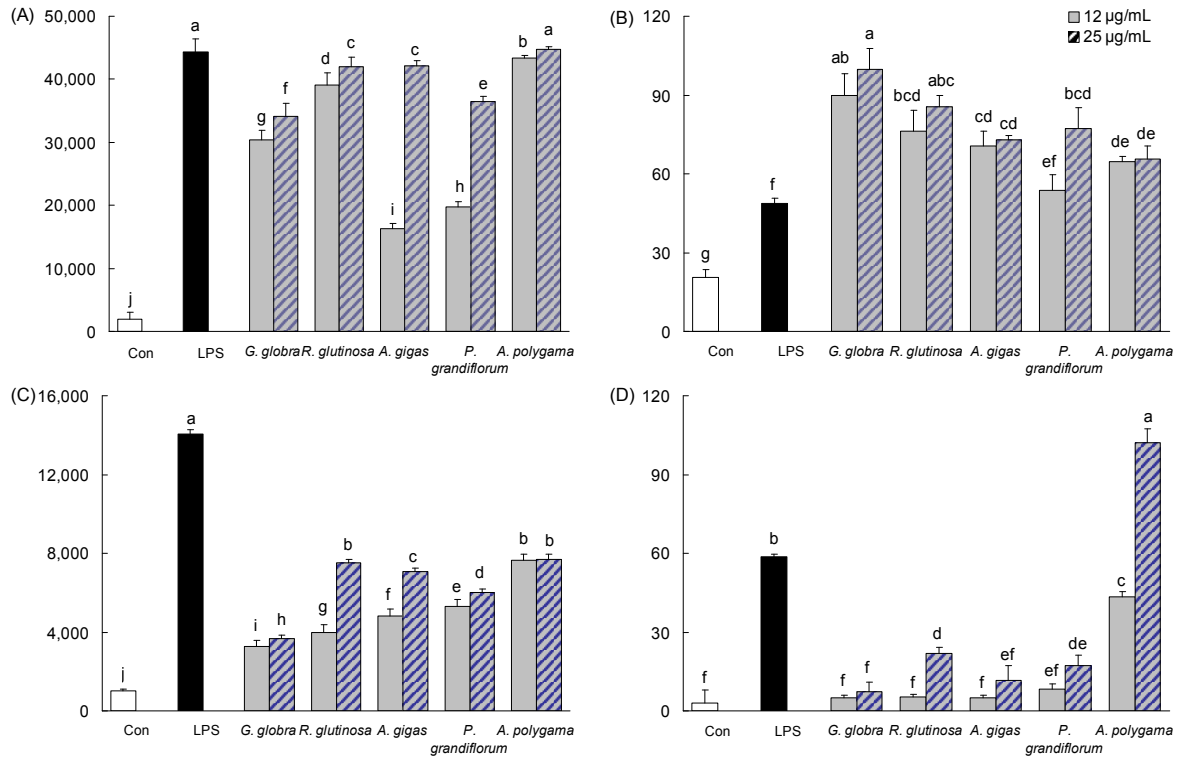

Fig. 3. Effect of medicinal herb extracts on the cytokines production by RAW 264.7 macrophage. Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one-way ANOVA test ($p<0.05$).

는 다양한 기능을 가진 cytokine으로서 B임파구의 항체생성 세포인 plasma cell 분화를 유도하는 활성이 있으며, 면역글로불린의 합성을 증진하고 다른 cytokine과 협동하여 상승작용을 나타내는 등 다양한 작용을 한다(20). 본 실험에서는 5종의 생약추출물을 농도별로 처리 시 양성 대조군인 LPS를 단독으로 처리한 것보다는 낮았지만, 25 μg/mL의 농도에서 대조군보다 각각 3.2, 3.9, 4.8, 5.3, 7.6배 높게 나타났다(Fig. 3C). Ryu(17)의 연구에서 율무 물추출물을 10 μg/mL의 농도로 대식세포에 처리 시 대조군보다 5.9배 높은 IL-6 생성량을 보였다고 보고한 바가 있고, Lee 등(22)의 연구에서 국화과 약용식물의 IL-6 생성량이 대조군보다 높았으며, 물 추출물보다는 에탄올추출물에서 더 높은 IL-6가 생성되었다고 보고하였다. 따라서 본 실험에 사용된 5종의 생약재도 다른 약용식물처럼 IL-6의 생성량을 증가시켜 B림프구를 분화시킴으로써 면역반응에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 여겨진다.

IL-10 생성능

5종의 생약재를 농도별로 대식세포에 처리 시 대조군에 비해 높은 IL-10을 생성하였으며, 특히 목천료(25 μg/mL)의 경우 LPS를 단독으로 1 μg/mL으로 처리한 것과 비교할 때 1.7배 높은 IL-10이 생성되었다(Fig. 3D). 이는 Bachiega와 Sforcin(21)의 연구에서 lemongrass 추출물을 대식세포에 처리한 결과 5, 10 μg/mL의 낮은 농도에서는 IL-10의 생성량이 증가하였으나 25, 50, 100 μg/mL의 농도에서는 IL-10 생성을 억제하였고, LPS를 처리한 후 lemongrass 추출물을 처리 시 IL-10의 생성이 감소되었다고 보고하였으나, 본 실험에서는 LPS 처리 없이 생약추출물만 처리하였을 때 농도 증가에 따라 IL-10의 생성이 증가된 것으로 볼 때 생약재는 외부의 자극을 받기 전에 체내의 면역세포인 대식세포를 활성화시켜 외부 자극에 대한 방어기작을 통해 면역증강을 기대할 수 있을 것으로 예상된다.

T세포 증식능

비장세포는 혈액에서 유래된 항원에 대한 면역 반응이 개시되고 발전되는 부위로서 말초 림프 기관에 속하며, 그 크기나 세포의 수가 직접적인 지표로 이용될 수 있으므로 대표적인 면역 지표로 사용된다(22). 우리몸의 전체 림프구중 비장에 분포되어 있는 림프구는 T세포가 60%, B세포가 30% 정도로 T세포의 비율이 높다. 본 연구에서는 T세포주인 Molt-4 세포에 5종의 생약추출물을 12, 25 μg/mL의 농도로 처리하여 48시간 배양 후 증식능을 측정하였고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 5종의 생약추출물은 아무것도 첨가하지 않은 대조군에 비해 세포증식이 최대 1.29배 증가하였다. 이는 Ryu 등(8)의 연구에서 혼합식품 추출물의 증식능을 관찰한 결과 대조군에 비해 증가를 나타내었다는 보고와 Ryu 등(23)의 연구에서 함초추출물을 T세포에 96시간 배양하여 증식능을 관찰한 결과 대조군보다 유의적으로 상승하였다는 결과와 일치하였다. 따라서 생약추출물이 면역세포인 T세포의 활성을 촉진시켜 체내 면역능을 증진시킬 가능성이

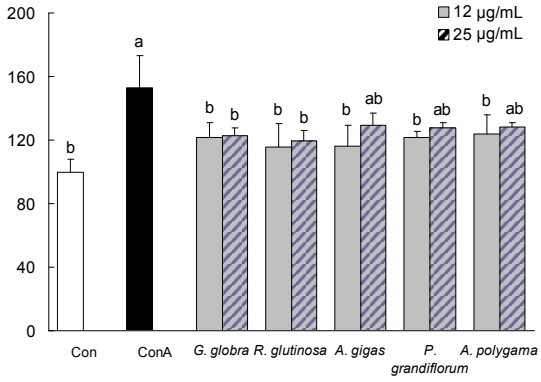

Fig. 4. Effect of medicinal herb extracts on proliferation rate of T cells. Values with the different letters above bargraphs are significantly different by one-way ANOVA test ($p<0.05$).

있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서 12종류의 생약재 중 대식세포를 활성화시켜 NO 생성능이 높은 감초, 건지황, 당귀, 도라지, 목천료 5종의 생약재를 선별하였다. 선별된 5종의 생약추출물의 성분을 실험한 결과 단백질, 다당 물질의 함유량이 감초(58.1%), 건지황(90.4%), 당귀(87.4%), 도라지(41.3%), 목천료(85.7%)로 대부분 고분자 물질이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 생약추출물이 대식세포를 활성화시켜 면역을 증진시키는 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7세포와 T세포를 이용하여 면역활성능 관련 지표를 측정한 결과 5종의 생약재를 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 면역 활성의 지표가 되는 NO, cytokine(TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10)의 생성이 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가되었고, Molt-4 세포에 처리하였을 때 대조군에 비해 세포가 증식되었다. 이와 같은 결과는 고분자 물질인 단백질과 다당으로 이루어진 생약추출물을 섭취 시 외부로부터 침입한 항원이 들어오기 이전에 면역세포를 자극하여 활성을 증가시켜 면역매개물질을 생성하여 인체의 비특이적 면역반응을 증가시킴으로써 항원을 공격, 제거하는 등의 작용을 통해 자연 면역반응에 있어 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 보인다.

문 헌

1. Lee SY. 2000. Use and perspective views of oriental herbs in food industry. *Food Ind Nutr* 5: 21-26.
2. Yoon TJ. 2008. Effect of water extracts from root of *Taraxacum officinale* on innate and adaptive immune responses in mice. *Korean J Food & Nutr* 21: 275-282.
3. Kim HS, Kang JS. 2008. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 109-116.
4. Bae CH, Kim JC, Kim YJ, Kim SG, Na KH, Park BT, Kim HH. 2007. Purification efficiency of a lectin from *Maackia fauriei*. *Yakhak Hoeji* 51: 259-263.
5. Jung EB, Jo JH, Cho SM. 2008. Nutritional component and anticancer properties of various extracts from Haesongi mushroom (*Hypizigusz marmoreus*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1395-1400.
6. Bae IL, Min HY, Han AR, Seo EK, Lee SK. 2005. Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazilin in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 513: 237-242.
7. Kim YH, Yoon HJ, Moon ME, Lee JH, Park HS, Kim JS. 2005. Production of NO, TNF-α and IL-6 by squalene, alkoxy glycerol, batyl and chimyl solutions in RAW 264.7 macrophage cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1503-1508.
8. Ryu HS, Kim JH, Kim HS. 2008. Effects of plant water extract mixture *Ixeris sonchifolia* Hance, *Oenanthe vjavanica*, *Fagopyrum esculentum* Moench, *Hizikia fusiforme*, *Zingiber officinale Roscoe* on mouse immune cell activation ex vivo. *Korean J Nutr* 41: 141-146.
9. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. 1998. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94.
10. Nathan CF. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319-326.
11. Aranha I, Clement F, Venkatesh YP. 2012. Immunostimulatory properties of the major protein from the stem of the Ayurvedic medicinal herb, guduchi (*Tinospora cordifolia*). *J Ethnopharmacol* 139: 366-372.
12. Yu Q, Nie SP, Li WJ, Zheng WY, Yin PF, Gong DM, Xie MY. 2012. Macrophage immunomodulatory activity of a purified polysaccharide isolated from *Ganoderma atrum*. *Phytother Res* doi: 10.1002/ptr.4698
13. Han XQ, Chan BC, Yu H, Yang YH, Hu SQ, Ko CH, Dong CX, Wong CK, Shaw PC, Fung KP, Leung PC, Hsiao WL, Tu PF, Han QB. 2012. Structural characterization and immuno-modulating activities of a polysaccharide from *Ganoderma sinense*. *Int J Biol Macromol* 51: 597-603.
14. Kim GY, Lee JY, Lee JO, Ryu CH, Choi BT, Jeong YK, Lee KW, Jeong SC, Choi YH. 2006. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1218-1226.
15. Lee JH, Kim YS, Lim EM. 2011. Effects of *Angelicae Pubescentis Radix* water extract on immune property in Raw 264.7 macrophages. *J Korean Oriental Med* 32: 175-184.
16. Shin HJ, Jeon YJ, Shin HJ. 2008. Physiological activities of extracts of *Cedrela sinensis* leaves. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 164-168.
17. Ryu HS. 2008. Effects of *Job's Tears* (*Yul-Moo*) extracts on mouse splenocyte and macrophage cell activation. *Korean J Food & Nutr* 21: 1-6.
18. Kounsar F, Rather MA, Ganai BA, Zargar MA. 2011. Immuno-enhancing effects of the herbal extract from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall. ex Meissn. *Food Chem* 126: 967-971.
19. Jeong HJ, Chung HS, An HJ, Kim JB, Lee EM, Park EJ, Jang CH, Hong SH, Kim HM. 2003. Immune-enhancement effect of the herbal combination Allergina. *Clin Chim Acta* 337: 77-84.
20. Cha JH, Kim YS, Lee EM. 2010. Effects of *Prunellae Spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J Oriental Obstet & Gynecol* 23: 91-100.
21. Bachiega TF, Sforcin JM. 2011. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *J Ethnopharmacol* 137: 909-913.

22. Lee MK, Moon HC, Lee JH, Kim JD, Yu CY, Lee HY. 2002. Screening of immune enhancing activities in medicinal herbs, *Compositae*. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 51-57.

23. Ryu DS, Kim SH, Lee DS. 2008. Immunomodulating activity of *Salicornia herbacea* extract. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36: 135-141.

(2012년 8월 27일 접수; 2012년 10월 12일 채택)