

## Effect of Fermented *Cudrania tricuspidata* Fruit Extracts on the Generation of the Cytokines in Mouse Spleen Cells

Min Jeong Seo<sup>1,2</sup>, Byoung Won Kang<sup>1</sup>, Jeong Uck Park<sup>1</sup>, Min Jeong Kim<sup>2</sup>, Hye Hyeon Lee<sup>2</sup>, Nam Hee Kim<sup>3</sup>, Kwang Hyuk Kim<sup>3</sup>, En Ju Rhu<sup>4</sup> and Yong Kee Jeong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Medi-Farm Industrialization Research Center, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine, Busan 602-708, Korea

<sup>4</sup>Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan 356-706, Korea

Received April 8, 2013 / Revised May 22, 2013 / Accepted May 22, 2013

We investigated a physiological function by fermenting a medicinal mushroom, (*Cudrania tricuspidata* fruit). A fermentation using lactic acid bacteria and the extracts isolated from 70% ethanol fractionation was included in cultured mouse spleen cells for cytokine secretion. As a result, total polyphenol content improved by 47% by organic acid fermentation. This was regarded as immune activity in fermented *C. tricuspidata* fruits, as the levels of interleukin (IL)-2 and IL-4 secretion increased. In addition, when the extracts were treated with a stimulant lipopolysaccharide, the secretion of helper T (Th) 1 cytokines IL-2, IL-12, and tumor necrosis factor- $\alpha$  was suppressed, while the secretion of Th2 cytokines IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10 significantly increased. Therefore, this study suggests that fermentative *C. tricuspidata* fruit extracts can contribute to the suppression of cellular immune reactions induced by the expression of Th1 cells and activation of the expression of Th2 cells inducing humoral immune reactions associated with the antibody generation by B lymphocytes.

**Key words** : *Cudrania tricuspidata*, T lymphocyte, cytokine, fermentation, *Lactobacillus* sp.

### 서 론

면역은 인체의 주요 방어기전으로서 감염작용에 대하여 다양한 면역세포들은 작용하여 병원성 미생물의 생체내 침입을 통제하거나 제거하도록 활성화하여 외부로부터 인체를 보호하게 된다[1]. 그 중 CD4+ T 림프구는 방어면역에 가장 중요하게 작용하는데, 이 세포의 활성화로 인하여 대식세포의 발달과 더불어 cytokine과 chemokine의 분비에 의해 염증부위로 호산구, 호염구, 호중구의 유도하여 자연면역반응 작용한다. 또한 항체의 생산과 CD8+ cytotoxic T lymphocyte의 license dendritic cells을 조절하는 B 림프구의 반응을 매개하여 적응면역반응을 유도한다[28]. 면역에서 중요한 역할을 하는 CD4+ T 림프구는 helper T (Th) 림프구로 명명되며 이 림프구에 의해 분비되는 cytokines의 종류에 따라 Th1 cell과 Th2 cell로 성숙되어 분화되며 서로 다른 면역작용에 관여하게 된다[21]. 그 중 Th1 cell 유도 cytokines은 interleukine (IL)-2, IL-12, in-

terferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 으로서 주로 세포매개성 면역작용을 활성화하며, Th2 cell 유도 cytokines은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10으로서 이들의 작용은 항체생성에 의해 조절되는 체액성 면역작용을 활성화하게 된다. 이들 cytokine에 의해 유도된 Th1과 Th2 cell은 서로 균형적으로 면역작용을 조절하게 된다[19, 23]. 이러한 면역작용 세포의 활성화를 유도하기 위하여 기능성 소재로서 면역증진에 기여하고자 상황버섯의 polysaccharide와 같이 천연물로부터 면역증진활성이 연구되어 왔다[16, 20, 29].

꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로서 한국을 비롯한 일본, 중국과 러시아 동부지역 등에서 많이 자생하며, 서아시아지역에서는 전통약초로서 사용되어 온 약재 중 하나로서 줄기가 주로 사용되며, 잎과 열매는 식용작물로 이용되어 왔다[5, 10]. 전통적으로 약리활성이 알려진 꾸지뽕의 줄기는 xanthones, flavonoids 등의 폴리페놀(polyphenol) 성분이 다량 함유되어 있으며, tyrosinase 저해, 항산화, 세포독성, 항염증 활성에 대한 연구가 보고되어 있다[12, 13, 17, 22, 24, 30]. 하지만 이들 연구는 주로 줄기에 대하여 많은 연구가 진행된 반면, 열매에 대한 연구는 essential oil의 항균활성, glycoprotein의 항산화 및 항염증 활성에 대한 연구가 보고되어 있을 뿐이다[2, 14]. 최근에는 생리활성이 있는 소재를 미생물을 이용하여 기능성 증진효과에 대한 연구가 많이 이뤄지고 있으며, 대표적으로 catechin류의 함량이 높은

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7557, Fax : +82-51-206-0848

E-mail : ykj9912@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

녹차를 발효하여 만든 흑차가 있으며, 발효과정 중에 catechin 류는 theaflavins과 thearubigins로 전환되며 세포독성과 같은 기능성은 증진된다고 보고되어 있다[7, 9]. 이처럼 기능성 폐놀 화합물이 많이 함유되어 있는 소재를 미생물로 발효하였을 때 성분이 전환되어 기능성 상승에도 밀접한 연관이 있을 것으로 사료된다.

따라서 건강 증진을 유도하는 기능성 식품의 개발에 따른 약리활성을 확인하고자 꾸지뽕 열매를 미생물로서 발효하여 면역증강 작용을 검토하고자 하였는데, 이미 고초균을 이용하여 발효한 추출물의 항산화 특성과 elastase 및 tyrosinase 저해 활성에 대하여 연구가 진행된 바 있다[15]. 하지만 본 연구에서는 고초균을 이용한 발효에서 가지는 단점인 향미와 다양한 발효효과를 확인하기 위하여 유익한 미생물인 유산균을 이용하였으며, 생리기능성으로서는 발효한 꾸지뽕 열매를 추출물을 마우스 비장세포에 작용하였을 때 분비되는 cytokines으로서 면역활성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 동물 및 시약

실험에 사용된 마우스는 C57BL/6 마우스로서 생후 6~8주령, 체중 25 g 내외의 것을 대한바이오링크(음성군, 충청북도)로부터 구입하여 실험에 사용하였으며, 배지는 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Gallic acid, fetal bovine serum (FBS), concanavalinA (ConA), folin-ciocalteu reagent는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, lipopolysaccharide (LPS)는 *Escherichia coli* (serotype 026:B6)에서 분리정제된 제품을 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 마우스 cytokines의 측정은 ELISA MAXTM Deluxe set kit (BioLegend, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 흡광도 측정은 microplate reader (Bio-Rad, Richmond, VA, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 발효 및 추출물의 제조

본 실험에 사용한 꾸지뽕 열매는 밀양 꾸지뽕 농장(밀양, 경상남도)에서 동결건조된 것을 구입하여 사용하였다. 발효에 사용한 균주는 분양받은 *Lactobacillus casei* KCRZ 1121, *Lactobacillus plantarum* ATCC 10830 균을 사용하였으며, 각각의 균은 37°C에서 18시간 동안 MRS broth (Difco™ Lactobacilli MRS broth, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 전 배양하여 사용하였다. 꾸지뽕 열매의 발효는 동결건조된 열매를 분쇄하여 80°C에서 10분간 건조하여 살균한 후 전 배양한 균주를 각각 10% 접종하여 37°C에서 72시간 동안 incubator (Multi Room Incubator LMI-2004R, 대한과학, 한국)에서 발효하였다. 발효된 꾸지뽕 열매는 10배수의 70% Ethanol을 가하여 24시간 동안 추출하였으며, 추출한 여액은

0.45 mm membrane filter (EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA)로 여과하여 감압농축 한 후 농축액을 동결건조한 꾸지뽕 열매 추출물(FCT)을 실험재료로 사용하였다. 대조구로서는 꾸지뽕 열매 추출물(CT)을 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀의 함량은 Folin-Ciocalteu법을 이용하여 측정하였다[27]. 96 well plate에 시료 20 ul와 10배 희석한 Folin-Ciocalteu reagent 100 ul를 혼합하여 5분간 반응시킨 후 7.5% sodium bicarbonate solution 80 ul를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 정치 반응하였으며, 반응한 시료는 750 nm에서 흡광도 측정하였다. 총 폴리페놀의 함량은 gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하였다.

### 마우스 비장세포의 분리

마우스 비장세포를 얻기 위하여 CO<sub>2</sub> gas 처리하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하였으며, 유출된 비장세포는 10% FBS를 함유하고 있는 RPMI 1640에 세포의 농도가 2×10<sup>5</sup> cells/ml이 되도록 현탁하여 24 wells tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 각각 1 ml씩 분주하였다. 준비된 세포배지에 최종농도가 LPS와 꾸지뽕 열매 추출물에 대하여 2 µg/ml와 10 µg/ml가 되도록 각각 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 6, 24, 48, 72시간 배양 하였다. 이때 추출물들은 10 µg/ml 에서는 세포독성이 없었으므로 이 농도를 처리농도로 하였다. 배양한 배양액은 300× g에서 10분간 원심분리 한 후 분리된 상층액을 취하여 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

### 마우스 cytokine IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, TNF-α의 측정

마우스 비장세포로부터 분리되는 cytokines은 IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, TNF-α를 각각 측정하였다. 측정은 96 wells microplate 에 마우스 cytokine IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, TNF-α의 capture antibody를 coating buffer에 희석한 후 100 µl 분주하여 4°C에서 16~18시간 동안 방치하였다. Capture antibody를 코팅한 96 wells microplate는 washing buffer (1 M phosphate buffer containing 0.5% Tween 40)으로 4회 washing한 후 assay diluent 200 µl를 분주하여 실온에서 1 시간 동안 교반하여 반응하였으며, 반응 후 washing buffer로 세척하여 세포 배양액을 100 µl 분주하여 2 시간 동안 반응하였다. 그리고 다시 washing buffer로 washing 하여 detection antibody를 100 µl 분주하여 1시간 동안 반응하였으며, 이를 washing buffer로 세척 후 avidine-horseradish peroxidase를 100 µl 분주하여 30분간 반응 하였다. 반응한 96 wells microplate를 washing buffer로 washing 하여 tetramethylbenzidine액을 넣은 후 20분간 정치 반응한 후 stop solution (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 분주하여 반응을 정지 하였으며, optical density는 microplate reader를 이용하여

450 nm에서 측정하였다.

**통계학적 분석**

동일 실험을 3회 반복하여 실시하였으며 실험성적은 평균± 표준편차로 나타내었고 각 군의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하여  $p$ 값이 0.05 미만 수준에서 통계적 유의성을 검토하였다.

**결 과**

**총 폴리페놀 함량**

꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 변화되는 총 폴리페놀의 함량의 변화를 확인하였다. 그 결과 CT와 FCT에서 68.62±2.29, 100.93±1.89 ug/mg의 폴리페놀의 함량을 나타내었으며, 이는 유산균 발효에 의하여 꾸지뽕 열매에 함유된 폴리페놀의 함량이 약 47% 증가함을 확인하였다.

**Cytokines IL-2의 생성의 변화**

꾸지뽕 열매가 발효에 의해 유도되는 cytokine IL-2의 생성의 변화는 C57/BL6 마우스로부터 분리된 비장세포에 10 µg/ml의 CT와 FCT를 각각 처리하여 비교하였으며, 분비되는 양을 6, 24, 48, 72시간 동안 측정하여 확인하였다. 그 결과 cytokine IL-2의 생성은 6, 24시간에는 FCT가 대조구와 CT 보다 낮은 분비량을 나타내었으나, 48시간부터 생성량이 증가하였다. 그리고 72시간부터 생성량이 대조구보다 높은 분비량을 나타내었으며, FCT가 CT보다 72시간에 1.6배 이상의 높은 분비량을 나타내어 꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 IL-2의 분비가 증대하는 것을 확인하였다(Fig. 1).

**Cytokines IL-4의 생성의 변화**

꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 유도되는 cytokine IL-4의 분비의 변화는 FCT가 대조구와 CT보다 높은 분비량을 나타내었으며, 시간이 경과함에 따라 분비량이 유의적으로 증가하였다. 그리고 생성의 변화는 CT에서는 6시간에 분비가 증가되어 24시간부터 분비량이 일정하게 유지되어 변화가 없었으나, FCT에서는 6시간에 분비량이 증가하다 24시간에는 감소하였지만 48시간부터 증가하였으며 전체적인 분비량은 증가하는 것을 확인하여 꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 IL-4의

Table 1. Contents of total phenolic compounds of *C. tricuspidata* fruit extract (CT) and fermented *C. tricuspidata* fruit extract (FCT)

Sample	Total phenolic contents (ug/mg)*
CT	68.62±2.29
FCT	100.93±1.89

\*Values are the mean±S.D.

분비량을 증대하였음, 시간에 따라 분비의 변화도 증가시킴을 확인하였다(Fig. 2).

**LPS 자극에 의한 cytokines IL-2, IL-12, TNF-α 생성의 변화**

꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 유도되는 Th1 cytokine 인 IL-2, IL-12, TNF-α의 분비의 변화는 FCT와 CT를 자극제 LPS와 함께 처리하였을 때 생성되는 cytokine 분비량으로 확인하였다. 그 결과 FCT와 CT에서 IL-2의 분비량의 변화는 LPS 처리군과 유사한 분비의 변화를 보였으며, 24시간에는 높은 분비를 나타내었으나 72시간에는 LPS처리군보다 낮은 분비량을 나타내었으며, FCT가 CT보다 높은 분비량을 나타내었다 (Fig. 3A). IL-12 분비량의 변화는 6, 24시간에 FCT와 CT가 LPS 처리군과 유사한 분비량을 나타내었으나, 48시간 후부터

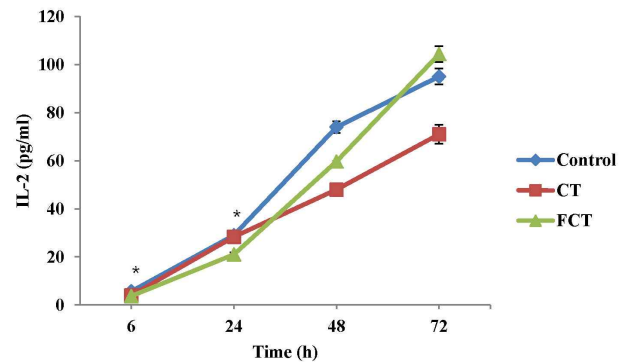


Fig. 1. Production of IL-2 cytokine by fermented *C. tricuspidata*-fruit extract (FCT) and *C. tricuspidata* fruit extract (CT) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 µg/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean±SD. \*Significant difference from control  $p < 0.05$ .

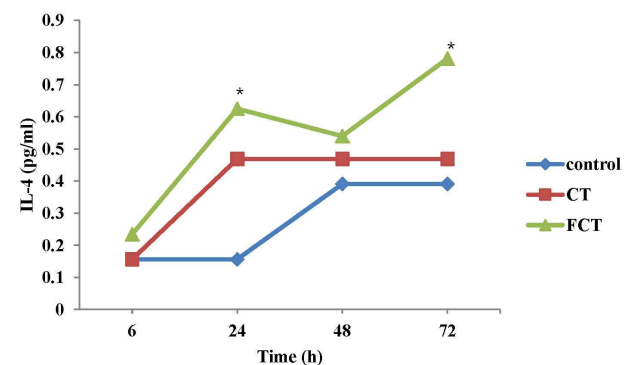


Fig. 2. Production of IL-4cytokine by fermented *C. tricuspidata*-fruitextract (FCT) and *C. tricuspidata* fruit extract (CT) in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10 µg/ml extract for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean±SD. \*Significant difference from control  $p < 0.05$ .

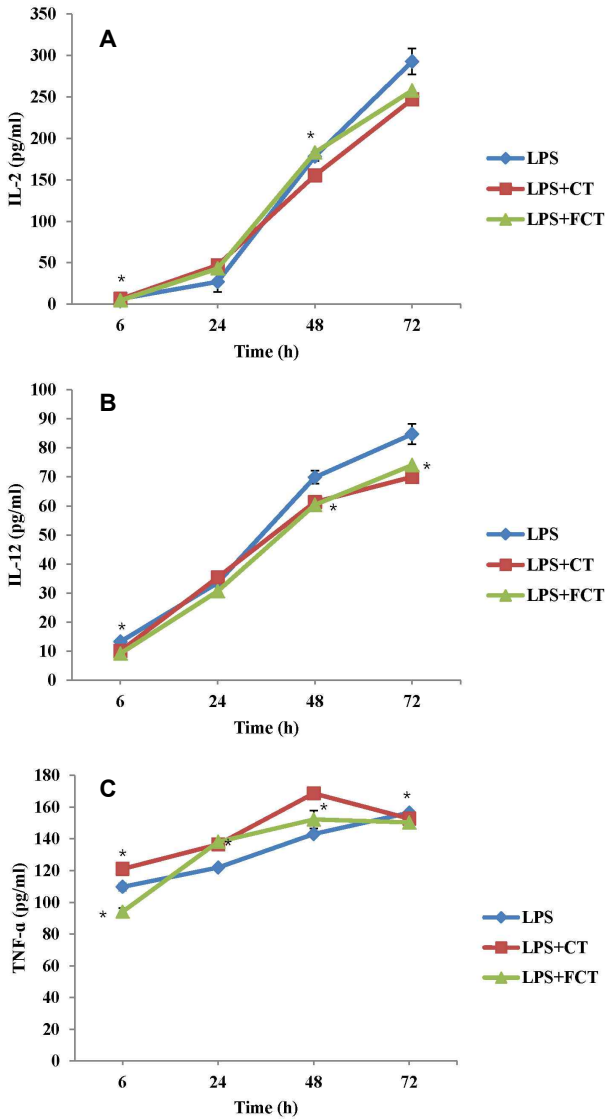


Fig. 3. Production of IL-2 (A), IL-12 (B) and TNF- $\alpha$  (C) cytokines by fermented *C. tricuspidata* fruit extract (FCT) and *C. tricuspidata* fruit extract (CT) with LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10  $\mu$ g/ml extracts and 2  $\mu$ g/ml LPS for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean $\pm$ SD. \*Significant difference from control  $p < 0.05$ .

LPS 처리군 보다 낮은 분비량을 나타내었다(Fig. 3B). TNF- $\alpha$  분비의 변화는 6시간에 LPS 처리군 보다 CT는 높은 분비량을 나타내었으나, FCT는 낮은 분비량을 나타내었다. 그리고 24, 48시간에는 LPS 처리군보다 높은 분비량을 나타내며 유사한 분비의 변화를 보였으며 72시간에는 LPS 처리군과 같은 분비량을 나타내었다(Fig. 3C). 따라서 LPS 자극에 의한 발효 꾸지뽕 열매추출물로부터 Th1 cytokine인 IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ 의 분비는 억제되는 것을 확인하였다.

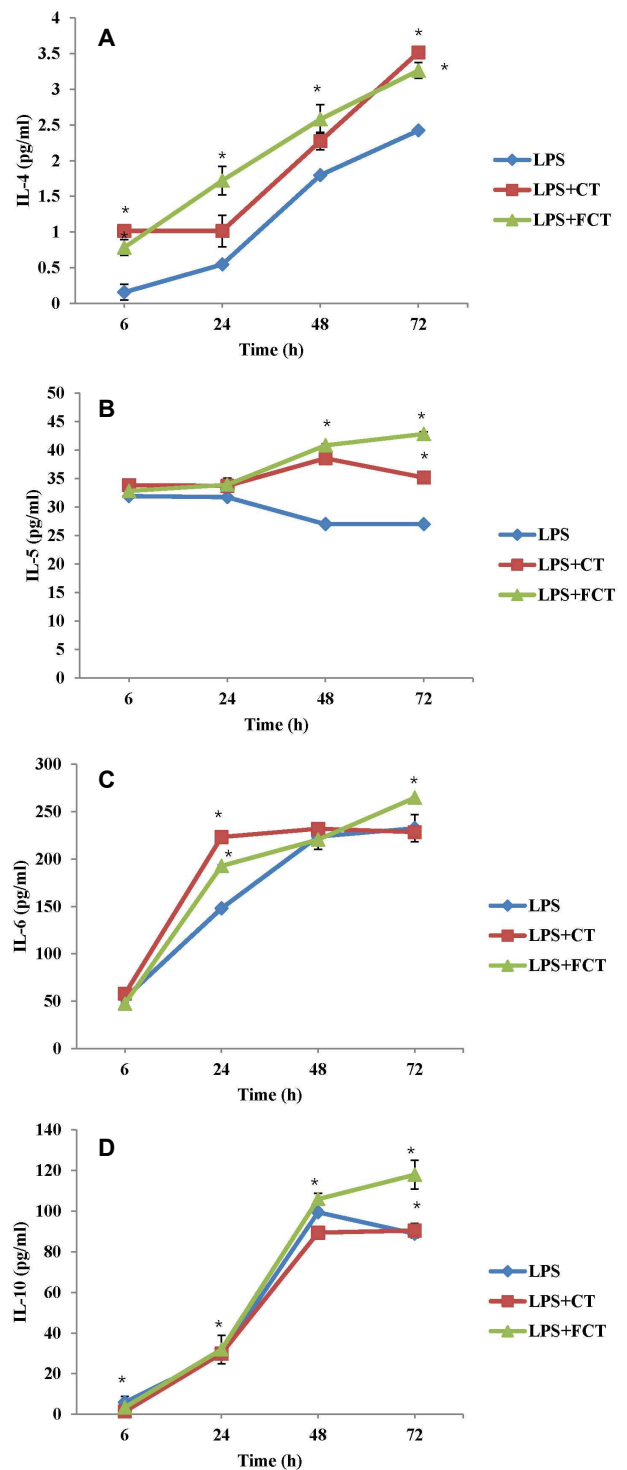


Fig. 4. Production of IL-4 (A), IL-5 (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) cytokines by fermented *C. tricuspidata* fruit extract (FCT) and *C. tricuspidata* fruit extract (CT) with LPS in mouse spleen cells. Spleen cells were cultivated with 10  $\mu$ g/ml extracts and 2  $\mu$ g/ml LPS for 6, 24, 48, 72 hr respectively. Data are shown as mean $\pm$ SD. \*Significant difference from control  $p < 0.05$ .

### LPS 자극에 의한 cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 생성의 변화

꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 유도되는 Th2 cytokine 인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 분비의 변화를 확인하였다. 그 결과, IL-4의 분비량의 변화는 FCT와 CT가 LPS 처리군보다 높은 분비량을 나타내었다. 그리고 분비의 변화는 6시간에 CT가 FCT와 유사한 분비량이 나타났으나, 24시간부터 FCT가 유의적으로 분비량이 증가하다 72시간에는 CT와 유사한 변화를 나타내어 FCT가 시간에 따라 분비량이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4A). IL-5의 분비는 초기 6, 24시간에는 FCT, CT, LPS 처리군 모두 유사한 분비의 변화를 나타내었으나, 48시간 후부터 LPS 처리군은 분비량이 감소하였으나, FCT, CT에서는 분비량이 증가하였으며, FCT가 더 높은 분비량을 나타내었다(Fig. 4B). IL-6의 분비는 6시간에서는 유사한 분비량을 보였으나, 24시간에는 FCT와 CT가 LPS 처리군보다 높은 분비를 나타내었으며, CT가 FCT보다 높은 분비를 보였지만 48시간에는 LPS 처리군과 CT에서는 분비의 변화가 없으나 FCT의 분비량이 유의적으로 증가하여 72시간에 높은 분비량을 확인하였다(Fig. 4C). IL-10의 분비는 LPS 처리군, CT, FCT에서 거의 같은 분비의 변화를 보였으나, 48시간 후부터 FCT에서 유의적으로 분비량이 증가하여 72시간에 높은 분비량을 나타내었으며, CT와 LPS 처리군에서는 분비량이 감소하였다(Fig. 4D). 따라서 꾸지뽕 열매가 발효에 의해 Th2 cytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10의 분비량은 증가하였으며, 시간이 경과함에 따라 발현이 증대되는 것을 확인하였다.

## 고 찰

약용식물로서 알려져 있는 꾸지뽕은 많은 생리기능성이 연구되어 있는데, 최근 면역에 대한 관심이 증대하면서 분리된 Cudraticusxanthone A로부터 항염증작용이나 benzyl dihydroflavonols로부터 세포독성효과에 대한 연구들이 진행되고 있다[13, 18]. 하지만 이들 연구는 약제로 이용되어온 줄기에 대한 연구만 치중되어 왔으며, 식용작물로서 이용되어 온 열매에 대한 연구는 미미한 편이다.

본 연구는 꾸지뽕 열매가 유산균 발효에 의해 면역작용에 관여하는 cytokine의 종류에 따라 유도되는 면역활성작용을 마우스 비장세포를 통해 검토하고자 하였다. 꾸지뽕 열매를 유산균에 의한 발효과정에 의해 함유되어 있는 주요 성분들인 폴리페놀의 함량에서 FCT가 CT보다 약 47% 높은 함량을 나타내었는데, 이 결과는 청국장으로부터 분리된 고초균을 이용하여 꾸지뽕 열매를 발효하였을 때 폴리페놀 함량이 중간 접종에 의한 발효에 의해 그 함량이 35~46% 증가함을 보고한 결과와 일치하였다[15]. 이 결과로서 꾸지뽕 열매에 함유되어 있는 폴리페놀 성분이 미생물에 의해 합성이 유도되는 것을 직간접적으로 확인하였으며, 이러한 폴리페놀은 식물에 다량

함유되어 있는 기능성성분으로서 미생물에 의해 발효함으로써 성분의 변화 및 기능성의 증가가 보고되어 있다[9].

IL-2는 주로 T cell proliferation factor로서 활성화된 T 림프구에 의해 분비되거나 활성화된 Tcell의 증식에 필수적인 cytokine으로 작용하며, IL-4는 B cell의 성장과 분화를 유도하는 cytokine으로 알려져 있다[8, 11]. 이러한 IL-2와 IL-4 cytokine의 생성이 CT와 FCT를 처리하였을 때 생성이 IL-2에서는 낮은 분비를 나타내었지만 시간에 따른 후기의 분비량이 증가하였으며, 또한 IL-4에서는 높은 분비량을 보였으며, 이들의 생성은 발효과정을 거친 FCT에서 높은 분비량을 나타내어 FCT는 IL-2, IL-4 cytokine의 분비를 조절하여 T림프구의 증식을 유도하여 이들의 활성화에 따른 면역반응을 유도하며 B cell의 성장과 분화를 유도하는 적응면역작용에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

또한 자극제 LPS의 유도에 의해 각각의 면역반응의 과정 중 Th1 cell유도 cytokine인 IL-2, IL-12의 생성은 FCT와 CT가 LPS 처리군보다 억제됨을 확인하였으며, TNF- $\alpha$ 의 생성은 초기에 일시적으로 증가하였다가 억제되는 경향을 나타내었다. TNF- $\alpha$ 는 전신성 염증과, 급성반응을 조절하는 cytokine이다. 주로 활성화된 대식세포에서 생성되며, 또한 CD4+ T cell이나 NK cell에서도 생성되며 면역세포를 조절하는 주요 작용을 하는 cytokine이다[3, 4]. 따라서 TNF- $\alpha$ 에 의한 급성염증반응으로 면역을 유도하여 면역조절을 나타내며, Th1 cell 유도 cytokine과 같이 억제됨에 따라 추후 면역반응조절 역할을 주요하게 작용하는 것으로 사료된다. 그리고 Th2 cell 유도 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10의 분비는 시간에 따라 증가하여 후기에 높은 분비량을 보였으며, 특히 FCT가 CT보다 높은 분비량을 나타내었다. 특히 IL-5의 발현 후기에 높은 분비를 나타내었는데, IL-5는 Th2 cytokine으로서 B세포의 성장에 관여하고, immunoglobulin의 생성에 기여한다[6, 25]. 따라서 IL-5의 생성과 더불어 Th2 cell 유도 cytokine의 생성이 증가함에 B의 성장과 분화에 따른 항체생성이 유도되는 면역반응으로 작용하는 것으로 사료된다. 그리고 IL-10은 Th1과 Th2의 면역반응을 교차조절(cross regulation)하여 면역반응을 조절하는 cytokine이다[26]. 이 cytokine의 분비가 후기에 높게 나타남에 따라 Th1 cell의 작용과 Th2 cell에 의한 면역반응을 균형있게 조절하는 것으로 사료된다. 이에 따라 꾸지뽕 열매의 면역활성은 Th1 cell 유도 cytokine의 발현은 억제되며, Th2 cell 유도 cytokine의 발현이 증대되었으며, 이 결과로서 Th2 cell의 활성화에 의해 B 림프구를 활성화하여 항체생성 면역반응인 체액성 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 발효에 의한 면역증강작용이 있으며, 특히 발효에 의해 생성이 증가된 폴리페놀 성분이 면역조절작용에 역할을 하는 것을 직간접적으로 추정할 수 있으며 앞으로 함유된 폴리페놀을 분리, 정제하여 주요물질을 확인해야 할 필요성이 요구된다.

따라서 꾸지뽕 열매의 면역효과의 확인과 더불어 발효에

의한 면역증강 효과는 꾸지뽕 열매를 활용한 다양한 기능성 식품소재 및 제품개발로서의 연구자료로서 활용이 가능하다고 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산물식품부(농림, 식품, 수산) 기술개발사업(610003-03-1-SB110)의 연구비지원에 의해서 수행되었습니다.

### Reference

- Ankathatti Munegowda, M., Xu, S., Freywald, A. and Xiang, J. 2012. CD4+ Th2 cells function alike effector Tr1 and Th1 cells through the deletion of a single cytokine IL-6 and IL-10 gene. *Mol Immunol* **51**, 143-149.
- Bajpai, V., Sharma, A. and Baek, K. H. 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control* **32**, 582-590.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., Mathison, J., Ulevitch, R. and Cerami, A. 1985. Identity oftumour necrosis factor and themacrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552-554.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factorthat causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 3666-3670.
- Choi, S. R., You, D. H., Jang, I., Ahn, M. S., Song, E. J., Seo, S. Y., Choi, M. K., Kim, Y. S., Kim, M. K. and Choi, D. G. 2012. Cytotoxicity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau. *Korean J Medicinal Corp Sci* **20**, 153-158.
- Dubucquoi, S., Desreumaux, P., Janin, A., Klein, O., Goldman, M., Tavernier, J., Capron, A. and Capron, M. 1994. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and I mmunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med* **179**, 703-708.
- Feng, Q., Torii, Y., Uchida, K., Nakamura, Y., Hara, Y., and Osawa, T. 2002. Black tea polyphenols, theaflavins, prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome P450 IAI in cell culture. *J Agric Food Chem* **50**, 213-220.
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richards]on, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M. A., Watson, J. D., Anderson, D. M. and Giri, J. G., 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* **264**, 965-968.
- Han, S. K., Song, Y. S., Lee, J. S., Bang, J. K., Suh, S. J., Cho, J. Y., Moon, J. H. and Park, K. H. 2010. Changes of the chemical constituents and antioxidant activity during microbial fermented tea (*Camellia sinensis* L.) processing. *Korean J Food Sci Technol* **42**, 21-26.
- Hano, Y., Matsumoto, Y., Sun, J. Y. and Nomura, T. 1990. Structures of three new isoprenylated xanthenes, cudrax-anthones E, F and G. *Planta Med* **56**, 478-481.
- Howard, B., Burrascano, M., McCallister, M., Chong, K., Gangavalli, R., Severinsson, L., Jolly, D. J., Darrow, T., Vervaert, C., Abdel-Wahab, Z., Siegler, H. F. and Barber, J. R. 1994. Retrovirus-mediated gene transfer of the human  $\gamma$ -IFN gene: a therapy for cancer. *Ann N Y Acad Sci* **716**, 167-187.
- Jeong, C. H., Choi, G. N., Kim, J. H., Kwak, J. H., Heo, H. J., Shim, K. H., Cho, B. R., Bae, Y. I. and Choi, J. S. 2006. Anti-atheroclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 5580-5583.
- Jeong, G. S., Lee, D. S. and Kim, Y. C. 2009. Cudratricusxanthone A from *Cudrania tricuspidata* suppresses pro-inflammatory mediators through expression of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol* **9**, 241-246.
- Joo, H. Y. and Lim, K. T. 2009. Glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau inhibits iNO and COX-2 expression through modulation of NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Environ Toxicol Phar* **27**, 247-252.
- Kang, D. H., Kim, J. W. and Youn, K. S. 2011. Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J Food Preserv* **18**, 236-243.
- Kim, H. M., Han, S. B., Oh, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int Immunopharmacol* **18**, 295-303.
- Lee, B. W., Lee, J. H., Lee, S. T., Lee, H. S., Lee, W. S., Jeong, T. S. and Park, K. H. 2005. Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 5548-5552.
- Lee, I. K., Kim, C. J., Song, K. S., Kim, H. M., Koshino, H., Uramoto, M. and Yoo, I. D. 1996. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* **41**, 213-216 .
- Liblau, R. S., Singer, S. M. and McDevitt, H. O. 1995. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* **16**, 34-38.
- Mahomoodally, F., Mesaik, A., Choudhary, M. I., Subratty, A. H., Gurib-Fakim, A. 2012. *In vitro* modulation of oxidative burst via release of reactive oxygen species from immune cells by extracts of selected tropical medicinal herbs and food plants. *Asian Pac J Trop Med* **5**, 440-447.
- Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* **7**, 145-173.
- Park, K. H., Park, Y. D., Han, J. M., Im, K. R., Lee, B. W., Jeong, I. Y., Jeong, T. S. and Lee, W. S. 2006. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 5580-5583.
- Rengarajan, J., Szabo, S. J. and Glimcher, L. H. 2000. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol*

- Today* **21**, 479-483.
24. Ryu, Y. B., Curtis-Long, M., Lee, J. W., Kim, J. H., Kim, J. Y., Kang, K. Y., Lee, W. S. and Park, K. H. 2009. Characteristic of neuraminidase inhibitory xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorgan Med Chem* **17**, 2744-2750.
  25. Sanderson, C. J. 1992. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* **79**, 3101-3109.
  26. Shawn, B., Danuta, M., Skowronski, G., Kent, H., Robert, C. and Brunham, L. 2004. Aggregate content influences the Th1/Th2 immuneresponse to influenza vaccine: Evidence from a mousemodel. *J Med Virol* **72**, 138-142.
  27. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* **299**, 152-178.
  28. Skapenko, A., Kalden, J. R., Lipsky, P. E. and Schulze-Koops, H. 2005. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol* **175**, 6107-6116.
  29. Yoshida, Y., Wang, M. Q., Liu, J. N., Shan, B. E. and Yamashita, U. 1997. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular. *Int Immunopharmacol* **19**, 359-370.
  30. Zheng, Z. P., Tan, H. Y., Chen, J. and Wang, M. 2013. Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure - activity relationship study. *Fitoterapia* **84**, 242-247.

초록 : 발효 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*) 열매 추출물이 마우스 비장세포의 cytokine 생성에 미치는 영향

서민정<sup>1,2</sup> · 강병원<sup>1</sup> · 박정욱<sup>1</sup> · 김민정<sup>2</sup> · 이해현<sup>2</sup> · 김남희<sup>3</sup> · 김광혁<sup>3</sup> · 류은주<sup>4</sup> · 정영기<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>동아대학교 Medi-Farm 산업화 연구사업단, <sup>2</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>3</sup>고신대학교 의학과, <sup>4</sup>한서대학교 피부미용학과)

꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*) 열매의 면역증강 작용을 검토하기 위하여 유산균을 이용하여 발효한 후 70% 에탄올 추출하여 그 추출물을 마우스 비장세포에 작용한 후 분비되는 cytokine으로 면역활성을 조사하였다. 그 결과 발효에 의해 성분의 변화로 총 페놀함량을 측정된 결과 발효에 의해 폴리페놀 함량이 약 47% 증가하였으며, 면역활성에서는 발효 꾸지뽕 열매에서 cytokine IL-2와IL-4의 분비량이 증가하였다. 그리고 LPS 자극제와 함께 처리하였을 때, Th1 cell 유도 cytokine인 IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ 의 분비는 억제되었으나, Th2 cell 유도 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10의 분비량이 유의적으로 증가하였다. 이는 발효 꾸지뽕 나무 열매 추출물이 Th1 cell의 발현에 의해 유도되는 세포성 면역작용 반응은 억제하며, B 림프구에 의한 항체생성과 관련된 체액성 면역작용을 유도하는 Th2 cell의 발현을 활성화 하는 것으로 사료된다.