

RAW 264.7 세포에서 발효 울금 추출물의 면역조절 효과

유선아¹ · 김옥경¹ · 남다은¹ · 김용재² · 백흥영² · 전우진³ · 이정민^{1,4*}

¹경희대학교 의학영양학과, ²한국인스팜(주) 중앙연구소
³전남대학교 식품영양학과, ⁴경희대학교 임상영양연구소

Immunomodulatory Effects of Fermented *Curcuma longa* L. Extracts on RAW 264.7 Cells

Seon A Yoo¹, Ok Kyung Kim¹, Da-Eun Nam¹, Yongjae Kim², Humyoung Baek²,
Woojin Jun³, and Jeongmin Lee^{1,4*}

¹Dept. of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Gyeonggi 446-701, Korea

²Korea INSPHARM Research Institute, Jeonnam 519-882, Korea

³Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

⁴Clinical Nutrition Institute, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT *Curcuma longa* L. (CL) is a well known traditional medicinal plant that is also used in curries and mustards as a coloring and flavoring agent. However, CL is not usually used as a food source due to its bitter taste. We investigated the immunomodulatory effect of CL fermented by *Aspergillus oryzae* (FCL) on RAW 264.7 cells. FCL was extracted with cold water (CW), hot water (HW), 20% ethanol (20% EtOH) and 80% ethanol (80% EtOH), after which its effects on phagocytic activity, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), nitric oxide (NO) production, natural killer (NK) cell activity and mRNA expression of LP-BM5 eco were investigated. Phagocytic activity was increased in HW and 20% EtOH when compared to the control. The secretion of nitric oxide (NO) from RAW 264.7 cells did not change significantly relative to the control. However, TNF- α was significantly increased by the addition of FCL extracts. Moreover, FCL 20% ethanol extract showed a four fold increase in NK cell cytotoxicity relative to the control group. Finally, we observed suppressed mRNA expression of LP-BM5 eco in FCL extracts, especially in the 20% ethanol extracts group. These results indicate that the FCL extracts can be used as a functional material due to their effective immunomodulating activities.

Key words: fermented *Curcuma longa* L., immunomodulating activity, RAW 264.7 cell, macrophage, NK cell

서 론

인체는 외부 병원체 등의 각종 외부 물질의 침입을 식별하고 이를 제거함으로써 몸을 보호하며 항상성을 유지하는 자기방어체계인 면역작용을 한다(1). 이러한 면역작용은 면역을 억제 조절하는 면역 관용과 면역을 증진하는 면역반응으로 나눌 수 있다. 이 두 가지의 면역작용에 의하여 면역조절, 즉 항상성이 이루어진다. 여러 원인에 의하여 면역조절이 불균형을 일으키게 되면 질병을 발생시키게 된다. 면역기능이 결핍되거나 저하된 상태에서는 면역반응이 제대로 활성화되지 못하고 체내의 이물질에 대한 반응을 제대로 못하여 감염을 일으키게 된다. 이와 반대로 일부의 면역반응이 과하게 반응하면 면역체계가 불균형을 이루어 결과적으로 자가면역질환, 알레르기 반응 등을 일으키게 된다(2,3). 따라서

인체의 면역반응은 균형을 이루어 조절이 정상적으로 되어야 건강함을 유지할 수 있다.

병원균이 인체에 침입하여 조직 내에서 복제를 시작하면 대식세포의 활성이 일어나 박테리아나 바이러스, 암세포 등을 인지하고 이에 대한 탐식작용(phagocytosis)을 일으켜 제거함으로써 방어 작용을 하며, 뿐만 아니라 면역반응 및 염증반응에 기여하는 nitric oxide(NO)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 cytokines을 생산한다(4-6). 정상적으로 발현되는 NO는 생체 내에서 혈압조절, 신호전달 등 다양한 작용을 한다. 이물질이 침입하였을 때에는 NO를 이용하여 박테리아나 바이러스 등을 막아 생체 방어 기전에 중요한 조절자로서 역할을 하지만 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극에 의해 활성화될 경우 과도한 NO가 생성되고 이는 염증에 관여하여 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발한다(7-9). 활성화된 대식세포에 의해 분비되는 TNF- α 는 질병에 있어 면역을 증강시키고 염증반응을 매개하며 이물질을 감염부위로 유인하여 방어 작용을 하는 cytokine이지만,

Received 23 September 2013; Accepted 17 December 2013

*Corresponding author.

E-mail: jlee2007@khu.ac.kr, Phone: +82-31-201-3779

전신적으로 유리되어 과도하게 생성될 때 염증성 질환을 유발시킬 수 있다(10,11). 이러한 대식세포에 의해 생산된 cytokines이나 바이러스 증식을 방해하는 interferon에 의해 NK 세포의 활성화가 일어나 바이러스에 감염된 세포를 선별적으로 사멸시키게 된다(12). 따라서 대식세포에 의한 NO와 TNF- α 등의 적절한 생성은 면역체계를 조절하는데 중요한 역할을 한다.

면역체계의 상호간 균형이 깨졌을 때 발생할 수 있는 질병을 예방하기 위해 면역 조절제 개발이 추진되고 있으나 부작용 및 문제점이 제기되어져 왔다. 이러한 문제점을 해결하고자 최근에는 안전성이 보고된 천연물의 면역조절 효능 연구가 다양하게 진행되고 있다(13). 이러한 천연물 중 하나인 울금(*Curcuma longa* L., tumeric)은 생강과에 속하는 다년생 초본식물로 노란색 향신료로 사용될 뿐만 아니라 염료와 식품의 착색제로 사용되고 있으며 중국, 인도, 일본 등 다른 아시아 국가에서 널리 재배되고 있다(14-18). 울금의 뿌리에서 추출된 커큐민(curcumin)은 가장 대표적인 성분으로 항균활성과 항산화효과(17,19), 항염증(20), 항암(21), 면역조절(14,22,23) 등이 보고되고 있다. 이러한 울금의 여러 기능성에도 불구하고 쓴맛, 강한 향으로 인해 소비자 선호와 이용률이 낮아지고 있어 이러한 문제점을 해결하고자 본 연구는 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 맛과 향을 개선한 발효 울금 추출물의 기능성을 확인하고자 한다. 주로 울금의 커큐민 성분에 대해 많은 기능성 연구가 보고되어져 왔으나 발효 울금에 대한 연구로는 간독성에 대한 보호 효과(15), 항비만(24), 피부 관련 생리활성 효과(25) 등으로 미비하게 진행되었으며 면역조절에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 발효 울금의 용매별 추출물을 이용하여 면역 조절에 효능을 확인하고 기능성 소재로서의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 울금은 한국인스팜(주)(Hwasun, Korea)에서 제공받았으며, *A.oryzae*는 충무발효(주)(Ulsan, Korea)에서 구입하였다. 발효에 사용할 원료는 정밀히 칭량해 121°C에서 20분간 가압 멸균하였다. 울금 중량 대비 2% *A. oryzae*를 접종한 후 발효조를 20분 회전하여 혼합하고 25±2°C, 습도 50±5%에서 36시간 동안 발효시켰다. 추출물 제조는 분말상태인 시료에 용매(정제수, 20% 에탄올, 80% 에탄올)를 첨가하고 실온 추출물(CW) 제조는 실온에서 5시간 추출, 열수 추출물(HW) 제조는 100°C에서 4시간 추출, 20% 주정 추출물(20% EtOH) 제조는 95°C에서 4시간 추출, 80% 주정 추출물(80% EtOH) 제조는 75°C에서 4시간 추출 후, 감압여과 장치에서 뜨거운 상태로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

세포배양

실험에 사용한 RAW 264.7 세포와 SC-1 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였고 YAC-1 세포는 경기대학교(Suwon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RAW 264.7 세포와 SC-1 세포는 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), 2 mmol/L glutamine, 100 mg/L penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM(Hyclone Laboratories)을 이용하였고, YAC-1 세포는 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories), 2 mmol/L glutamine, 100 mg/L penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 1640(Hyclone Laboratories)을 이용하여 37°C, 5% CO₂로 조절된 incubator(Heraeus BB15, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

세포독성

발효 울금 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 측정하기 위해 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주한 후 발효 울금 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양하였다. 3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 20 μ L 처리하여 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 3시간 배양한 후 상층액을 제거하고, DMSO(Sigma-Aldrich Co.) 200 μ L를 가하여 560 nm에서 ELISA reader(VERSAMAXSL-20, Molecular Devices, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

RAW 264.7 세포에서의 탐식작용 활성 측정

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10⁶ cells/well씩 분주한 후 24시간 동안 배양시켜 Cytoselect 96 well phagocytosis assay kit(Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 대식세포의 탐식능을 측정하였다. 본 실험에서 대식세포를 활성화시켜 탐식능을 증가시키기 위해 kit에 포함된 zymosan 입자를 사용하였다. Zymosan을 첨가하고 CW 200 μ g/mL, HW 400 μ g/mL, 20% EtOH 200 μ g/mL, 80% EtOH 100 μ g/mL로 처리하여 15분 동안 배양하였다. 그 후 serum free DMEM으로 세척 후 fixation solution을 첨가하고 5분 동안 상온에 방치하였다. 모든 well을 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS; Welgene, Daegu, Korea)으로 세척 후 1X blocking reagent를 첨가하고 orbital shaker(Daihan Scientific Co., Ltd., Wonju, Korea)를 이용하여 60분 동안 방치하였다. 모든 well을 DPBS로 세척 후 1X permeabilization solution을 첨가하고 5분 동안 상온에 방치하였다. 모든 well을 DPBS로 세척 후 1X detection reagent를 첨가한 후 orbital shaker를 이용하여 60분 동안 방치하였다. 모든 well을 DPBS로 세척 후 detection buffer를 첨가하고 orbital shaker를 이용하여 10분 동안 방치 후 substrate를 첨가하

고 10분 동안 배양하였다. ELISA reader(VERSAMAXSL-20, Molecular Devices)를 이용하여 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

NO와 TNF- α 분비량 측정

RAW 264.7 세포를 1×10^4 cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양한 후에 CW 200 μ g/mL, HW 400 μ g/mL, 20% EtOH 200 μ g/mL, 80% EtOH 100 μ g/mL로 처리하였다. NO는 양성 대조군으로 0.1 μ g/mL의 LPS(Sigma-Aldrich Co.)를 처리하여 72시간 배양한 후 상층액 50 μ L와 동량의 Griess reagent(Sigma-Aldrich Co.)를 혼합하여 15분 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF- α 의 경우 양성 대조군으로는 1 μ g/mL의 LPS를 처리하여 2시간 배양한 후 생성된 TNF- α 양을 DuoSet sandwich ELISA mouse TNF- α kit(R&D System, McKinley Place NE, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

YAC-1에 대한 natural killer(NK) 세포 활성 측정

C57BL/6 마우스로부터 비장을 적출하여 마쇄한 후 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine, 100 mg/L penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 1640으로 세척한 후 red blood cell lysing buffer(Sigma-Aldrich Co.)로 적혈구를 용혈시켜 비장세포 부유액을 만들어 96 well plate에 각 well당 1×10^3 cells/well씩 분주한 후 effector 세포로 이용하였다. Target 세포는 YAC-1 세포를 이용하였으며 effector 세포와 target 세포의 비율을 5:1로 조정하고 CW 200 μ g/mL, HW 400 μ g/mL, 20% EtOH 200 μ g/mL, 80% EtOH 100 μ g/mL로 처리하였다. 37°C, 5% CO₂에 4시간 동안 배양한 후 유리된 lactate dehydrogenase(LDH)를 cytotox 96 non radioactive cytotoxicity assay kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 사용하였다. ELISA reader를 이용하여 흡광도 490 nm에서 측정하여 계산하고 YAC-1세포의 사멸정도를 NK cell activity (%)로 나타내었다.

Real-time polymerase chain reaction에 의한 LP-BM5 eco 발현 측정

SC-1 세포를 6 well plate에 5×10^6 cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후 CW 200 μ g/mL, HW 400 μ g/mL, 20% EtOH 200 μ g/mL, 80% EtOH 100 μ g/mL를 세포에 분주하였다. 4시간 후 trypsin 0.25% solution(Hyclone Laboratories)으로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit(Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출을 실시하였다. iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위

하여 SYBR Green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 다음과 같다: GAPDH forward primer 5' CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA 3', reverse primer 5' GCG GCA CGT CAG ATC CA 3', LP-BM5 eco forward primer 5' CCA ATG TGT CCA TGT CAT TT 3', reverse primer 5' GCG ATG AGC AGA GAG AGA AAG 3'. Real-time PCR 반응은 총 20 μ L 내에 cDNA 2 μ L와 2X SYBR mix 10 μ L, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μ L를 1 μ L씩 첨가하였고, 나머지는 H₂O로 채워 주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 60°C에서 45초, extension을 72°C에서 45초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Applied Biosystems에서 제공하는 One step system software v2.1로 분석하였다.

통계처리

본 연구에서는 SPSS(Statistical Package for Social Science, version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였고, 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하였다. 두 그룹 간의 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였으며 각 실험군 간에 유의성을 *P*<0.05 수준에서 검정하였다.

결 과

세포독성

발효 울금 추출물의 적정농도를 결정하기 위해 발효 울금 80% 주정 추출물(80% EtOH)은 0~200 μ g/mL, 나머지 추출물은 0~1,000 μ g/mL 농도로 RAW 264.7 세포에 처리한 후 세포의 생존율을 측정하였다. 실험 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 CW와 20% EtOH는 200 μ g/mL 농도에서 각각 81.81±4.20%와 88.38±2.85%, HW는 400 μ g/mL 농도에서 80.17±7.70%, 80% EtOH는 100 μ g/mL 농도에서 86.68±3.11%의 생존율을 보였다. 따라서 이러한 각 용매별 추출물의 오차 범위를 감안하여 80~100% 이상 생존율을 보인 농도를 선택하여 추후 실험에 사용하였다(Fig. 1).

RAW 264.7 세포에서의 탐식작용 활성 측정

탐식작용을 자극시키는 zymosan을 처리한 군(positive control)에서의 탐식작용 활성을 100%로 비교하였을 때 정

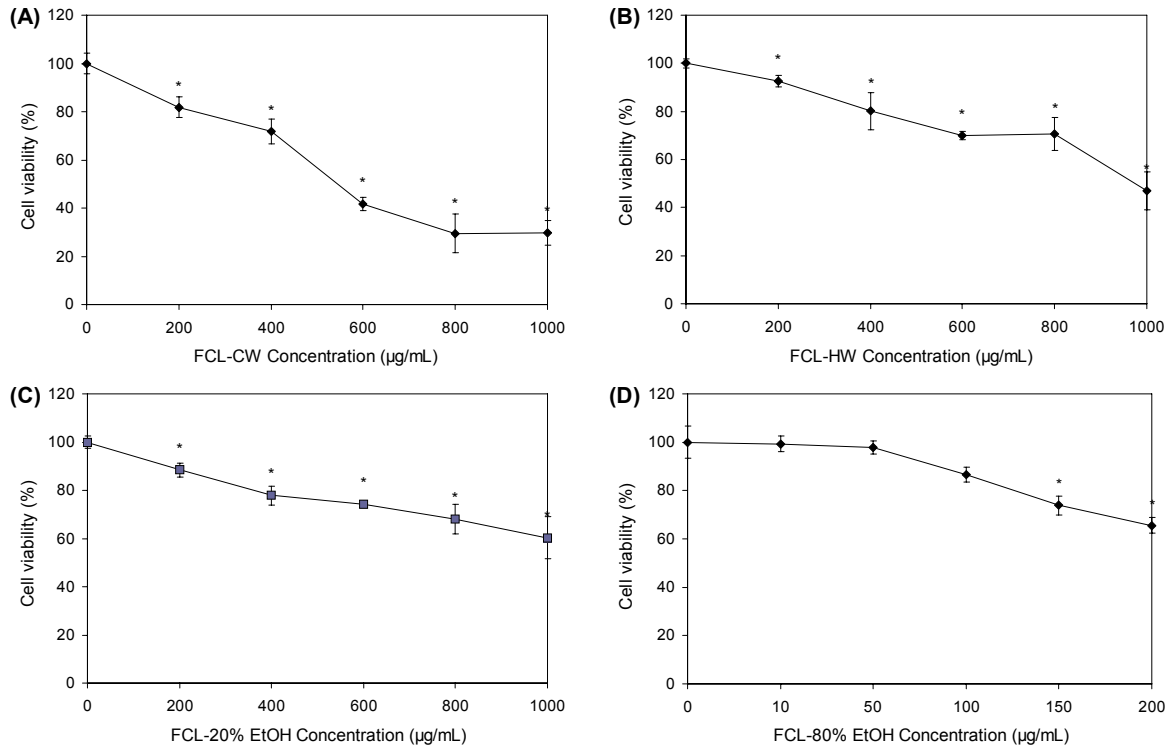


Fig. 1. Effect of fermented *Curcuma longa* L. (FCL) extracts on the cell viability of RAW 264.7 cell. The results are mean±SD of triplicate from a representative experiment ($P<0.05$; significantly different from the control). (A) FCL cold water extract, (B) FCL hot water extract, (C) FCL 20% ethanol extract, (D) FCL 80% ethanol extract.

상군의 $37.23 \pm 3.21\%$ 보다 유의적으로 63% 증가된 것으로 보아 zymosan이 정상적으로 작용하였음을 확인할 수 있었다($P<0.05$). HW와 20% EtOH에서는 zymosan만 처리한 군에 비해 각각 유의적으로 약 $123.79 \pm 4.71\%$, $118.41 \pm 11.21\%$ 증가하였음을 알 수 있었다($P<0.05$). 반면 CW는 $103.38 \pm 2.91\%$, 80% EtOH는 $104.23 \pm 1.69\%$ 로 zymosan만 처리한 군과 유의적으로 차이가 없었다(Fig. 2).

NO와 TNF- α 분비량 측정

LPS 처리는 염증반응을 일으켜 NO와 TNF- α 등의 관련 인자의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 과생성된 NO와 TNF- α 는 전신적 염증을 유발하여 생체에 여러 가지 부정적 영향을 미치기도 한다. 하지만 적정량의 NO와 TNF- α 의 생성은 오히려 선천성 면역의 중요한 인자로 여겨지기 때문에, 본 연구에서는 LPS를 처리한 군과 비교하여 LPS를 처리하지 않은 정상세포에 발효 울금을 처리할 때 선천성 면역을 활성화시킬 정도의 NO와 TNF- α 가 생성되는지 RAW 264.7 세포를 사용하여 관찰하였다.

NO의 경우 LPS가 처리되지 않은 정상군(control)에 비해 LPS만 처리된 군(LPS)에서 유의적으로 약 20배 많은 NO를 생성하였다. 반면 CW $0.67 \pm 0.44 \mu\text{M}$, HW $1.25 \pm 0.18 \mu\text{M}$, 20% EtOH $0.87 \pm 0.13 \mu\text{M}$, 80% EtOH $0.58 \pm 0.15 \mu\text{M}$ 의 NO 생성을 각각 나타내었으며 통계적 유의성은 보이지 않았다(Fig. 3).

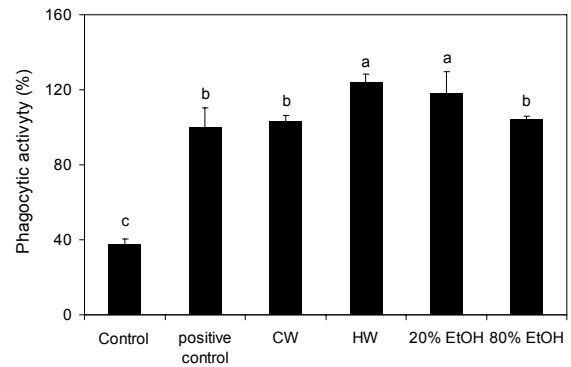


Fig. 2. Effects of fermented *Curcuma longa* L. (FCL) extracts on the phagocytosis of RAW 264.7 cells. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Control: cell only, Positive control: cell+zymosan, CW: cell+FCL cold water 200 $\mu\text{g/mL}$, HW: cell+FCL hot water 400 $\mu\text{g/mL}$, 20% EtOH: cell+FCL 20% ethanol 200 $\mu\text{g/mL}$, 80% EtOH: cell+FCL 80% ethanol 100 $\mu\text{g/mL}$.

TNF- α 의 경우 NO와 마찬가지로 이유로 정상세포에 발효 울금 추출물만을 처리하였을 때 LPS를 처리한 군(LPS)의 경우 LPS가 처리되지 않은 정상군에 비해 약 35배 유의적으로 높은 TNF- α 를 생성하였다. CW, HW, 20% EtOH만을 처리한 경우 각각 $1,313.07 \pm 254.40 \text{ pg/mL}$, $1,256.69 \pm 150.21 \text{ pg/mL}$, $477.35 \pm 139.13 \text{ pg/mL}$ 로 LPS를 처리한

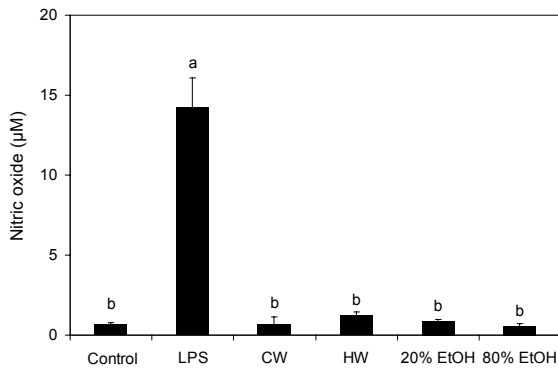


Fig. 3. Effects of fermented *Curcuma longa* L. (FCL) extracts on the nitric oxide production by RAW 264.7 cells. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Control: cell only, Positive control: cell+LPS 0.1 µg/mL, CW: cell+FCL cold water 200 µg/mL, HW: cell+FCL hot water 400 µg/mL, 20% EtOH: cell+FCL 20% ethanol 200 µg/mL, 80% EtOH: cell+FCL 80% ethanol 100 µg/mL.

군(LPS)보다는 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 반면 80% EtOH를 처리한 경우 222.07 ± 79.04 pg/mL로 정상군과 유의적으로 차이가 없었다(Fig. 4).

YAC-1에 대한 NK세포 활성 측정

YAC-1 세포의 사멸 정도를 측정함으로써 NK 세포의 활성을 평가하였다. 대조군과 CW, 80% EtOH는 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면 정상군과 비교하여 HW는 약 2배, 20% EtOH는 약 4배 높은 활성을 보이면서 통계적으로 유의적인 차이를 보였다($P<0.05$)(Fig. 5).

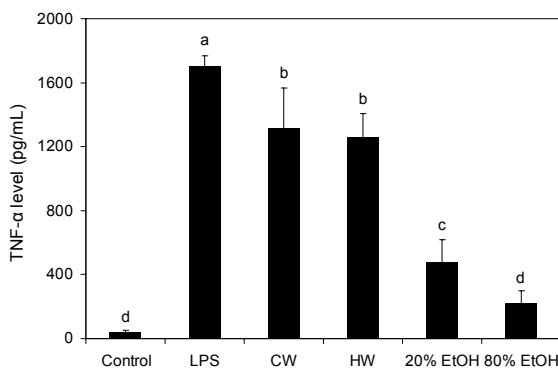


Fig. 4. Effects of fermented *Curcuma longa* L. (FCL) extracts on the TNF-α production by RAW 264.7 cells. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Control: cell only, Positive control: cell+LPS 1 µg/mL, CW: cell+FCL cold water 200 µg/mL, HW: cell+FCL hot water 400 µg/mL, 20% EtOH: cell+FCL 20% ethanol 200 µg/mL, 80% EtOH: cell+FCL 80% ethanol 100 µg/mL.

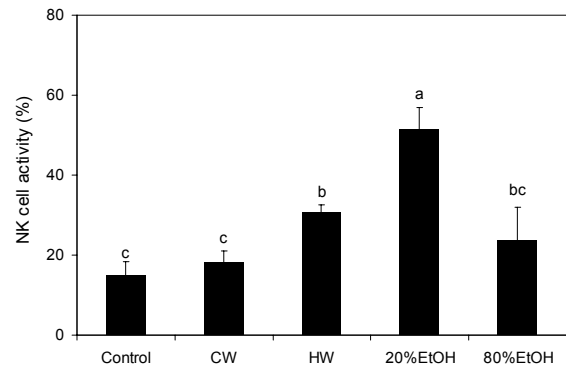


Fig. 5. Effects of fermented *Curcuma longa* L. (FCL) extracts on the NK cell activity by splenocyte. Effector cell : YAC-1=5:1. All data are presented as mean± standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Control: cell only, CW: FCL cold water 200 µg/mL, HW: FCL hot water 400 µg/mL, 20% EtOH: FCL 20% ethanol 200 µg/mL, 80% EtOH: FCL 80% ethanol 100 µg/mL.

Real-time PCR에 의한 LP-BM5 eco 발현 측정

LP-BM5 바이러스에 감염된 SC-1 세포를 이용하여 발효 올균 추출물이 LP-BM5 eco 발현 억제에 영향을 미쳤는지 관찰하였다. 발효 올균 추출물을 처리하지 않은 LP-BM5 바이러스에 감염된 SC-1 세포(control)의 LP-BM5 eco 발현과 비교하여 발효 올균을 처리한 군에서 CW는 0.599 ± 0.099 , HW는 0.607 ± 0.134 , 20% EtOH 0.321 ± 0.079 , 80% EtOH 0.598 ± 0.073 으로 모든 군에서 유의적으로 발현이 감소되었다($P<0.05$). 특히 20% EtOH이 가장 유의적으로 발현이 억제되었음을 관찰할 수 있었다($P<0.05$)(Fig. 6).

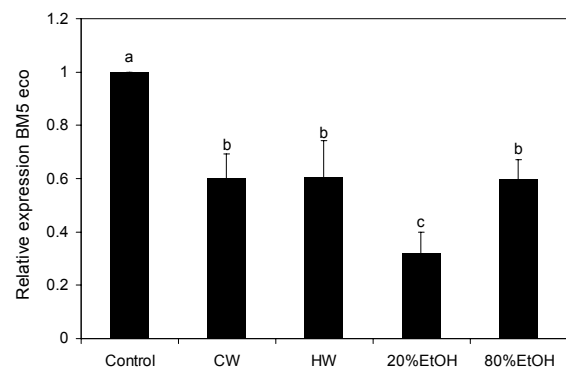


Fig. 6. Effects of fermented *Curcuma longa* L. (FCL) extracts on genetic expression of LP-BM5 ecotropic virus in SC-1 cell. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Control: SC-1/LP-BM5 virus cell, CW: FCL cold water 200 µg/mL, HW: FCL hot water 400 µg/mL, 20% EtOH: FCL 20% ethanol 200 µg/mL, 80% EtOH: FCL 80% ethanol 100 µg/mL.

고 찰

울금의 줄기, 뿌리 성분은 항산화 및 다양한 생리적 활성을 지녔다고 연구 보고되었으며 이러한 효능은 울금의 주성분인 커큐민에 의하여 나타난다고 보고되었다. 커큐민은 병리학적인 상태에서 선천 면역과 적응 면역에서 큰 영향을 미치며, T 세포, B 세포, 백혈구, 대식세포 등의 기능을 조절하는데 효과적이라 연구된 바 있다(23). 이러한 뛰어난 생리적 활성을 지닌 울금은 특유의 맛과 향으로 인해 이용률이 낮아 산업적으로 문제점을 지니고 있다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 이번 연구에서 *A. oryzae*를 이용하여 발효시킨 후 각 용매별로 추출하여 사용하였으며, 이러한 발효 울금 추출물에서도 면역 조절 효능이 있는지 확인하고자 하였다. 따라서 RAW 264.7 세포를 이용하여 대식세포의 탐식작용 활성, NO 분비량, TNF- α 분비량, NK 세포 활성능, LP-BM5 바이러스에 감염된 SC-1 세포를 이용한 바이러스 억제능을 측정함으로써 발효 울금 추출물의 면역조절 효능을 평가하였다.

대식세포는 거의 모든 조직에 존재하여 체내에 외부 물질이 침입하면 탐식작용을 함으로써 내재면역의 중요한 일차 방어로 작용한다. 탐식작용을 하는 동안 대식세포에서는 탐식된 병원균을 죽이기 위하여 다양한 독성 물질들을 생산한다. 중요한 독성 물질 중 하나가 NO이며, 선천 면역과 적응 면역 간 경계에서 중요한 역할을 하여 세균, 바이러스, 미생물 등의 병원균을 사멸시키는 매개체로 작용한다(26). 하지만 과량의 NO는 정상적인 세포조직에게 독성물질로 작용할 수 있으며 염증 질환 및 자가 면역 질환 등의 면역관련 질환과 패혈성 쇼크를 일으킬 수 있다(27). 활성화된 대식세포는 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 등의 cytokines를 분비하여 면역계 세포를 활성화시키고 적응면역반응을 유발시킴으로써 감염인자를 제거하는 염증반응을 활성화시킨다. 이 중 TNF- α 는 감염을 국소화하는 중요한 역할을 한다. 정상적인 면역계에서는 TNF- α 가 감염 부위에 작용해 염증반응을 일으켜 다양한 방법으로 효과적인 숙주 방어의 역할을 담당하게 된다. 하지만 과량의 TNF- α 분비가 일어나면 전신적으로 염증을 유발시켜 염증성 질환을 일으키게 하거나 혈관 확장, 혈압강하, 혈관의 투과성 증가에 의해 쇼크를 일으킬 수 있다(28-30). 따라서 대식세포에 의한 NO와 TNF- α 의 적당한 분비는 면역반응을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 하게 된다.

본 연구에서는 발효 울금 추출물의 처리만으로 대식세포 활성에 미치는 영향과 NO와 TNF- α 의 분비량을 측정함으로써 면역 조절에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 대식세포의 탐식작용과 TNF- α 의 분비가 추출 용매별로 차이를 보였지만 증가되었음을 확인하였다. TNF- α 분비량의 증가는 LPS로 분비를 자극시킨 군보다 낮은 분비량을 보이면서 정상군보다 높은 분비량을 유도시켜 면역반응을 증가시켰음을 볼 수 있다. Bisht 등(31)의 연구에서 커큐민을 처리했

을 때 정상군보다 TNF- α 가 유의적으로 증가하였으며, 이러한 결과는 기초적으로 염증이나 면역반응을 증가시키는 것으로 보고하였다. 발효하지 않은 울금의 커큐민 함량은 약 2.5 mg/g이었으며, *A. oryzae*를 이용하여 발효한 발효 울금의 커큐민 함량은 약 2.2 mg/g으로 측정되었다고 보고된 바 있다(24). 따라서 발효 울금 추출물의 TNF- α 분비 증가의 결과는 발효 울금에 포함된 커큐민의 효능이라고 예상할 수 있다. 또한 대식세포의 활성화에 의한 TNF- α 분비량의 증가로 볼 수 있으며 이러한 결과는 발효 울금 추출물이 면역반응을 증가시켰음을 알 수 있게 하였다.

바이러스와 같은 병원균은 체내에 들어와 복제를 위해 숙주세포 내로 침투한다. 이러한 병원균이 세포로 들어가는 것을 차단하거나 들어간 세포를 찾아 제거함으로써 질병의 발생을 막는 면역반응이 일어나야 한다. 따라서 정상적인 면역계의 상태에서는 병원균이 세포에 들어가기 전에 대식세포의 탐식작용에 의하여 제거되거나 NK 세포의 감염된 세포를 인지하여 사멸시키는 반응이 일어난다. NK 세포는 interferon이나 대식세포 유래 cytokines에 의하여 활성화되며 MHC class I 발현의 변화를 인식하여 비 감염세포에 대한 활성화를 막음으로써 감염세포만 선택적으로 세포사멸을 유도시킨다(32). 본 연구에서는 암세포인 YAC-1 세포를 사용하여 NK 세포의 YAC-1 세포 사멸 효능을 측정함으로써 NK 세포의 활성을 살펴보았다. 그 결과 열수 추출물과 20% 주정 추출물에서 각각 2배, 4배 가까운 유의적 활성을 관찰할 수 있었다. 결과적으로 바이러스 복제가 억제되었는지 살펴보기 위해 murine leukemia virus(MuLV) 혼합체 중 하나인 LP-BM5 eco의 발현을 측정하였다. 실험에 사용된 LP-BM5 virus는 비장비대증, 림프비대증, T 세포와 B 세포의 면역기능장애 등에 의해 특징지어진 murine leukemia retro virus이다(33). LP-BM5 virus에 노출시킨 SC-1 세포에서 바이러스의 복제 정도를 측정하기 위해 LP-BM5 eco의 발현을 측정하는 방법을 사용하였다. 그 결과 정상군에 비해 발효 울금 추출물의 처리가 유의적으로 LP-BM5 eco 발현을 억제한 것을 알 수 있었으며, 특히 20% 주정 추출물이 가장 많이 억제시켰음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 발효 울금 추출물이 면역관련 세포의 활성인자로 작용하며 결과적으로 바이러스의 복제를 억제시켰음을 확인하였다. 이러한 효능을 통하여 발효 울금은 억제된 면역을 증가시켜 염증성 질환을 예방하고 면역과민 반응을 감소시켜 면역 조절 및 항상성을 유지하여 자가 면역 질환 및 알레르기를 억제시킬 수 있을 것이라고 사료된다. 따라서 추후 면역 조절 기능성 식품의 상업화에 기초 자료가 되어 국내 기능성 소재로서의 활용을 기대할 수 있다.

요 약

본 연구에서는 울금의 선호도 및 이용율을 높이기 위해 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 발효시킨 후 용매별 추출을

통하여 얻은 발효 울금 추출물들을 사용하여 면역조절 효과를 살펴보았다. MTT assay를 이용하여 실온 추출물 200 µg/mL, 열수 추출물 400 µg/mL, 20% 주정 추출물 200 µg/mL, 80% 주정 추출물 100 µg/mL의 농도가 적정하다고 판단되어 추후 실험에 사용하도록 하였다. 면역조절 효과를 보고자 대식세포의 탐식작용 능력, nitric oxide(NO), TNF-α 생성, NK 세포 활성화, SC-1 세포에서 발현되는 LP-BM5 virus의 LP-BM5 eco 유전자 발현을 측정하였다. NK 세포의 활성을 측정한 결과 NK 세포는 YAC-1 세포에 대한 cytotoxicity를 관찰했을 때 20% 주정 추출물이 가장 활성을 나타내는 것으로 확인하였다. 발효 울금 추출물 중 열수 추출물과 20% 주정 추출물은 대식세포를 활성화시킴으로써 탐식능력을 증가시켰다. NO 생성을 관찰했을 때 발효 울금 처리에 의해 활성화된 대식세포는 효과를 나타내지 않았으나 80% 주정 추출물을 제외한 추출물에서 TNF-α 생성을 정상군에 비해 유의적으로 증가시켰다. SC-1 세포에 있는 LP-BM5 eco 유전자 발현을 비교하여 바이러스 복제 억제능을 측정한 결과 모든 추출물이 유의적으로 억제되었으며, 특히 20% 주정 추출물이 가장 많이 억제하고 있는 것을 확인할 수 있다. 이러한 연구 결과로부터 발효 울금이 면역조절 효과를 가진 천연 기능성 소재로 개발에 있어 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 기술사업화지원사업에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5: 772-782.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
- Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. 2007. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 7: 52-63.
- Rosenthal AS. 1978. Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response. *Immunol Rev* 40: 136-152.
- Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H. 1984. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 160: 310-316.
- Shevach EM, Rosenthal AS. 1973. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med* 138: 1213-1229.
- Ding AH, Nathan CF. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407-2412.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol* 15: 252-259.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Mollanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets* 4: 471-479.
- Medzhitov R, Janeway CA JR. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9: 4-9.
- An CS, Jin HL, Jeon YH, Bak JP, Kim JD, Yoon JH, Lim BO. 2010. Immunoregulatory effects of water extracts of *Inonotus obliquus* in carbon tetrachloride-induced liver damage animal model. *Kor J Med Cro Sci* 18: 1-8.
- Chace JH, Hooker NA, Mildenstein KL, Krieg AM, Cowdery JS. 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* 84: 185-193.
- Tong H, Song X, Sun X, Sun G, Du F. 2011. Immunomodulatory and antitumor activities of grape seed proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 21: 11543-11547.
- Gao X, Kuo J, Jiang H, Deeb D, Liu Y, Divine G, Chapman RA, Dulchavsky SA, Gautam SC. 2004. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 68: 51-61.
- Kim YJ, You YH, Jun WJ. 2012. Hepatoprotective activity of fermented *Curcuma longa* L. on galactosamine-intoxicated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 790-795.
- Kim MS, Chun SS, Kim SH, Choi JH. 2012. Effect of turmeric (*Curcuma longa*) on bile acid and UDP-glucuronyl transferase activity in rats fed a high-fat and cholesterol diet. *J Life Sci* 22: 1064-1070.
- Kim HJ, Lee JW, Kim YD. 2011. Antimicrobial activity and antioxidant effect of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma zedoaria*. *Korean J Food Preserv* 18: 219-225.
- An BJ, Lee JY, Park TS, Pyeon JR, Bae HJ, Song MA, Baek EJ, Park JM, Son JH, Lee CH, Choi KI. 2006. Antioxidant activity and whitening effect of extraction conditions in *Curcuma longa* L. *Korean J Medicinal Crop Sci* 14: 168-172.
- Selvam R, Subramanian L, Gayathri R, Angayarkanni N. 1995. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). *J Ethnopharmacol* 47: 59-67.
- Chainani-Wu N. 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 9: 161-168.
- Ryu SR, Han KJ, Jang HD. 2005. Separation and purification of effectiveness components from ulgeum (*Curcuma longa*) & the test study of anticancer effects that use its. *Appl Chem* 9: 69-72.
- Varalakshmi Ch, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Srivastava RM, Singh S, Khar A. 2008. Immunomodulatory effects of curcumin: *in vivo*. *Int Immunopharmacol* 8: 688-700.
- Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. 2011. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int Immunopharmacol* 3: 331-341.
- Ho JN, Jang JY, Yoon HG, Kim Y, Jun W, Lee J. 2012. Anti-obesity effect of a standardized ethanol extract from *Curcuma longa* L. fermented with *Aspergillus oryzae* in ob/ob mice and primary mouse adipocytes. *J Sci Food Agric* 92: 1833-1840.
- Oh SJ, Mo JH. 2013. A study on skin related physiological activity of *Curcuma longa* and fermented *Curcuma longa*

- extracts. *J Korean Soc Beauty and Art* 14: 185-195.
26. Ghosh DK, Stuehr DJ. 1995. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 34: 801-807.
 27. Szabó C. 1995. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz* 3: 2-32.
 28. Nam SH, Rhee YK, Hong HD, Lee YC, Kim YC, Shin KS, Cho CW. 2012. Immuno-modulatory activity of the crude polysaccharide from wild ginseng adventitious root. *Korean J Food & Nutr* 25: 755-761.
 29. Kim JJ, Lee HJ, Yee ST. 2012. Effect of *Pueraria thunbergiana* extracts on the activation of immune cells. *J Life Sci* 22: 1107-1113.
 30. Tracey KJ, Cerami A. 1994. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45: 491-503.
 31. Bisht K, Choi WH, Park SY, Chung MK, Koh WS. 2009. Curcumin enhances non-inflammatory phagocytic activity of RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 632-636.
 32. Dokun AO, Kim S, Smith HR, Kang HS, Chu DT, Yokoyama WM. 2001. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* 2: 951-956.
 33. Chattopadhyay SK, Sengupta DN, Fredrickson TN, Morse HC 3rd, Hartley JW. 1991. Characteristics and contributions of defective, ecotropic, and mink cell focus-inducing viruses involved in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome of mice. *J Virol* 65: 4232-4241.