

면역결핍 동물모델에서 울금 주정 추출물의 면역조절 효과

김옥경¹ · 유선아¹ · 남다은¹ · 김용재² · 김 은² · 전우진³ · 황권택⁴ · 이정민^{1,5}

¹경희대학교 의학영양학과, ²한국인스팸(주) 중앙연구소, ³전남대학교 식품영양학과
⁴남부대학교 식품영양학과, ⁵경희대학교 임상영양연구소

Immunomodulatory Effects of *Curcuma longa* L. Extract in LP-BM5 Murine Leukemia Viruses-induced Murine Acquired Immune Deficiency Syndrome

Ok Kyung Kim¹, Seon A Yoo¹, Da-Eun Nam¹, Yongjae Kim², Eun Kim²,
Woojin Jun³, Kwontack Hwan⁴, and Jeongmin Lee^{1,5}

¹Department of Medical Nutrition and ⁵Clinical Nutrition Institute, Kyung Hee University

²Korea INSPHarm Research Institute

³Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

⁴Department of Food and Nutrition, Nambu University

ABSTRACT The immune system protects the body against harmful substances and infectious agents. Normally, the body can maintain a state of immune homeostasis. However, failure of immune homeostasis results in severe diseases when the immune system is defective. We investigated the immunomodulatory effect of *Curcuma longa* L. extract in LP-BM5 MuLV (murine leukemia viruses)-induced murine AIDS (acquired immune deficiency syndrome). Mice were divided into six groups: normal control, infected control (LP-BM5 MuLV infection), positive control (LP-BM5 MuLV infection+dietary supplement of red ginseng 200 mg/kg), CL50 (LP-BM5 MuLV infection+dietary supplement of *Curcuma longa* L. 20% alcohol extract 50 mg/kg), CL200 (LP-BM5 MuLV infection+dietary supplement of *Curcuma longa* L. 20% alcohol extract 200 mg/kg), and CL500 (LP-BM5 MuLV infection+dietary supplement of *Curcuma longa* L. 20% alcohol extract 500 mg/kg). We found that dietary supplementation with *Curcuma longa* L. 20% alcohol extract inhibited elevation of spleen, lymph node, and liver weights as well as reduction of T- and B-cell proliferation and natural killer cell activity induced by LP-BM5 MuLV infection. Moreover, *Curcuma longa* L. 20% alcohol extract inhibited Th1 (IL-2, IFN- γ)/Th2 (IL-4, IL-10) cytokine imbalance and pro-inflammatory cytokine production. In conclusion, these data suggest that *Curcuma longa* L. has immunomodulatory effects in LP-BM5 MuLV-induced murine AIDS.

Key words: immunomodulatory effect, *Curcuma longa* L., LP-BM5 murine leukemia viruses, cytokines, murine acquired immune deficiency syndrome

서 론

면역체계는 외부의 다양한 해로운 물질과 감염원, 알레르겐 등으로부터 인체를 보호하는 방어 체계로서 질병의 발생을 억제시키는 역할을 한다. 이러한 면역체계는 면역억제와 증진의 작용으로 항상성을 유지하여 면역조절을 한다(1). 면역 항상성이 불균형을 일으키게 되어 면역조절이 실패하게 되면 질병을 발생시켜 건강을 유지하기 어려워진다. 따라서 건강한 인체를 유지하기 위해 면역조절 능력을 키우는 것이 중요하다(2). 최근 국내 건강기능식품 소비자 실태조사에 따르면 건강기능식품 구매 시 고려하는 건강문제가 ‘면역력

증진’이라고 답한 응답자가 46.9%로 2위에 해당하였다. 면역 질환 발병률이 증가하는 만큼 소비자들의 면역력 증진 관련 건강기능식품에 관심이 증가하고 있으며 이에 따른 소재 개발 연구도 증가하고 있다(3).

면역체계에 문제를 일으키는 감염성 질환 중 가장 심각한 질환은 HIV(human immunodeficiency virus, 인간 면역결핍 바이러스) 감염에 의한 AIDS(acquired immune deficiency syndrome, 후천성 면역결핍 증후군)이다. HIV 감염은 바이러스 감염에 대한 면역반응은 일어나지만 바이러스를 제거하지 못하고 무증상 시기인 잠복기간을 거쳐 AIDS로 발전되어 면역력을 감퇴시켜 여러 감염성 질환에 노출된다(4). MAIDS(murine acquired immune deficiency syndrome, 마우스 후천성 면역결핍 증후군)는 LP-BM5 MuLV (murine leukemia viruses) 감염에 의한 동물 질환으로서, 인간 AIDS와 유사한 면역체계 이상을 보이기 때문에 MAIDS

Received 20 May 2014; Accepted 26 June 2014

Corresponding author: Jeongmin Lee, Department of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea
E-mail: jlee2007@khu.ac.kr, Phone: +82-31-201-3779

모델은 면역결핍 연구에 사용하기 적절하다(5). LP-BM5 MuLV 감염은 비장비대증, 고감마글로불린혈증(hypergammaglobulinemia), 림프절 장애 등을 일으키는 특징을 가지고 있다. 또한 CD4⁺ T helper(Th) 세포의 감소와 기능 이상을 일으킨다(6,7). 이로 인하여 Th1 type cytokines의 생산은 감소시키고 Th2 type cytokines의 생산은 증가시킴으로써 Th1/Th2 type cytokines의 불균형이 일어나고, 이는 B 세포의 활성을 자극시켜 면역글로불린 생산을 증가시킨다. 뿐만 아니라 pro-inflammatory cytokines의 증가로 바이러스 복제를 더욱 증가시키게 된다(8). 반면 IL-12와 IL-15는 감소되어 NK(natural killer) 세포의 활성을 감소시켜 바이러스 감염 세포의 사멸 활성을 감소시키게 된다(9).

HIV/AIDS의 발병률은 전 세계적으로 증가하고 있으나 완치를 위한 치료법은 아직 개발되지 않았으며, 면역력 유지를 위한 항 HIV 약제는 지속적으로 투여하여야 하므로 부작용이 따르고 있다. 이에 따라 면역조절제와 치료 물질에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있으며, 최근에는 식이요법과 천연물 투여를 통하여 면역조절 능력을 증가시켜 AIDS 환자의 조기사망을 예방하는 연구도 보고되고 있다(10). 이에 따라 면역조절에 긍정적인 효능을 보이는 천연물을 개발하기 위한 연구의 일환으로 본 연구를 진행하였으며, 많은 연구를 통해 다양한 생리활성이 밝혀진 울금(*Curcuma longa* L. tumeric)의 면역조절 효과를 평가하였다. 울금은 생강과에 속하는 식물로서 향신료로 널리 사용되고 있으며 중국, 인도, 일본 등 다른 아시아 국가에서 널리 재배되고 있다(11). 울금의 뿌리에서 추출된 커큐민(curcumin)은 가장 대표적인 성분으로 항산화 효과(12), 항염(13), 면역조절(14) 등의 다양한 생리활성을 지닌다고 보고된 바 있으나, LP-BM5 MuLV 감염 모델에서의 면역조절에 관한 연구는 진행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 LP-BM5 MuLV 감염 동물모델에서의 비장세포의 cytokines 생산, 혈장 면역글로불린 농도, T 세포 및 B 세포의 증식능, NK 세포의 활성능 측정을 통하여 울금 주정 추출물이 면역조절 효과에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 울금은 한국인스팜(주)(Hwasun, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 분말상태인 시료에 20% 에탄올을 첨가하고 95°C에서 4시간 동안 reflux 하여 추출하였다. 추출물은 여과지(Whatman filter paper No. 6, Whatman, Newton, MA, USA)로 여과한 후 회전진공농축기로 감압 농축하여 동결건조 한 다음 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

실험동물, 사육조건 및 식이조성

본 연구에 사용한 실험동물은 경희대학교 동물실험윤리

위원회(KHUASP(SE)-14-006)의 승인을 받아 진행하였다. 4주령 된 C57BL/6 수컷 마우스를 샘타코(Osan, Korea) 실험동물 사육장으로부터 구입하여 동물 사육실에서 일정한 조건(온도: 23±2°C, 상대습도: 50±5%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 적응기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 평균 체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 각 군당 8마리의 마우스를 이용하여 군 분리를 하였다. 정상대조군(normal control), 감염대조군(infection control), 양성대조군(positive control, 홍삼 200 mg/kg b.w 식이투여군), 울금 20% 주정 추출물 50 mg/kg b.w 식이투여군(CL50), 울금 20% 주정 추출물 200 mg/kg b.w 식이투여군(CL200), 울금 20% 주정 추출물 500 mg/kg b.w 식이투여군(CL500)으로 분리하여 정상대조군을 제외한 모든 군의 마우스는 LP-BM5 MuLV 감염을 실시하였다. 모든 식이는 AIN 93G를 기본식으로 제작하였으며, 식이투여 동시에 LP-BM5 MuLV 감염 유발을 시작하였으며 실험 종료일까지 식이투여를 실시하였다. 실험기간 동안 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였고 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 체중과 식이섭취량을 측정하였다.

LP-BM5 바이러스 감염

LP-BM5 MuLV(NIAID, NIH, Bethesda, MD, USA)를 4.5 log₁₀ PFU(plaque forming unit)/mL로 적정하여 마우스의 복강 내에 0.1 mL씩 주사하여 1차 감염시켰다(15). 동일한 방법으로 5일 후 2차 접종을 실시하여 LP-BM5 MuLV 감염을 유발시켰다. 1차 접종 후 12주 후에 모든 마우스를 경추 탈골을 통해 희생시켜 간, 림프절, 비장을 분리하고 면역글로불린 측정을 위해 혈액을 얻었다.

비장세포 배양 및 T 세포 및 B 세포 증식능의 측정

모든 실험동물에서 분리한 비장은 PBS로 세척한 후 0.45 μm cell strainer를 사용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), 2 mmol/L glutamine(Hyclone Laboratories), 100 mg/L penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories)를 첨가한 RPMI-1640(Hyclone Laboratories)으로 세척 후 red blood cell lysing buffer(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈시켜 비장세포 부유액을 만들어 96 well plate에 각 well당 1×10⁶ cells/well씩 분주하였다. T 세포 증식능 측정을 위하여 concanavalin A(ConA)(Sigma-Aldrich Co.) 5 μg/mL를 처리하였고, B 세포 증식능 측정을 위하여 lipopolysaccharide(LPS)(Sigma-Aldrich Co.) 5 μg/mL를 처리한 후 48시간 동안 37°C에서 배양하였다. 48시간 후 EZ-CyTox(Deilab INC, Suwon, Korea)를 10 μL씩 분주하고 4시간 동안 37°C에서 배양시킨 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytokines 측정

비장세포를 96 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/well 씩 분주 후 ConA 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하여 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 생성을 자극시켰고, LPS 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하여 TNF- α , IL-6, IL-12, IL-15의 생성을 자극시켰다. IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IL-6는 24시간 배양 후에, IL-12와 IL-15는 48시간 배양 후에, IFN- γ 는 72시간 배양 후에 상층액을 수집하였다. 상층액의 cytokines의 양은 DuoSet Sandwich ELISA Mouse kit(R&D System, McKinley Place NE, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

혈중 면역글로불린 측정

모든 실험동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 혈청을 얻은 후 mouse immunoglobulin G(IgG) ELISA kit(Immunology Consultants Laboratory Inc., Newberg, OR, USA)를 이용하여 IgG를 측정하였다.

YAC-1에 대한 natural killer(NK) 세포 활성 측정

비장세포를 96 well plate에 각 well당 1×10^3 cells/well 씩 분주하여 effector 세포로 이용하였다. Target 세포로 사용한 YAC-1 세포는 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine, 100 mg/L penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 1640를 이용하여 배양하였고, 분주된 비장세포에 effector 세포와 target 세포의 비율을 10:1로 조절하여 분주하였다. 37°C, 5% CO₂에 4시간 동안 배양한 후 유리된 lactate dehydrogenase(LDH)는 CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit(Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 사용하여 측정하였다. ELISA reader를 이용하여 흡광도 490 nm에서 측정하여 계산하여 YAC-1 세포의 사멸 정도를 NK cell activity(%)로 나타내었다.

통계처리

본 실험 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science, version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균±표준편차(mean ±SD)로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성을 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

몸무게 및 조직 무게 변화 관찰

LP-BM5 MuLV에 감염으로 인한 MAIDS 동물은 인간 AIDS와 유사하게 비장비대증과 림프절 장애 등의 병리학적 변화를 나타낸다고 알려져 있다. 비장은 면역세포가 밀집되어 있어 면역체계에서 가장 중요한 림프기관으로, 항원이 제시되거나 면역반응이 급속하게 진행된다면 이에 반응하여 크기가 증가하여 비장비대증이 유발된다. 적응면역반응의 시작에 중요한 담당을 하는 림프절도 감염, 자가면역질환에 의한 면역반응으로 크기가 증가하게 된다(8,16). 또한 LP-BM5 MuLV의 감염 시 활성산소에 의한 산화적 스트레스가 급격히 증가하는 것으로 알려져 있으며 이로 인하여 간세포의 염증이 유발되고 지방간 등의 간질환이 일어나는 것으로 알려져 있다(17). 따라서 이러한 조직의 무게 증가는 LP-BM5 MuLV 감염이 정상적으로 발현되고 있음을 나타내는 지표가 되기도 한다. 본 연구에서는 마우스의 몸무게 변화와 조직 무게 변화를 측정하여 이러한 병리학적 변화를 관찰하였다. 국내에서 면역력 증진 기능성을 지닌 것으로 널리 알려진 홍삼을 양성대조군으로 사용하여 울금 주정 추출물과의 효능을 비교하였다.

실험동물의 몸무게와 장기 무게 변화 관찰 결과는 Table 1과 같다. 비장의 경우 정상대조군은 0.07 ± 0.01 g으로 나타난 반면 감염대조군은 0.84 ± 0.22 g으로 유의적인 차이를 보였다($P < 0.05$). 양성대조군과 CL50, CL200은 감염대조

Table 1. Effects of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on FER and organ weights of C57BL/6 mice with or without LP-BM5 murine leukemia viruses infection

Groups	Normal control	LP-BM5 MuLV infection				
		Infection control	Positive control	CL50	CL200	CL500
Weight gain (g) ¹⁾	6.33±0.65 ^b	9.96±2.27 ^a	10.34±1.79 ^a	10.61±2.46 ^a	12.18±2.85 ^a	11.50±2.89 ^a
FER ²⁾	0.027±0.002 ^b	0.051±0.010 ^a	0.048±0.008 ^a	0.052±0.057 ^a	0.057±0.013 ^a	0.049±0.012 ^a
Spleen (g)	0.07±0.01 ^c	0.84±0.22 ^a	0.66±0.13 ^{ab}	0.76±0.20 ^{ab}	0.69±0.04 ^{ab}	0.57±0.21 ^b
Lymph node (g)	0.06±0.01 ^c	4.71±0.87 ^a	2.09±0.78 ^b	4.11±1.16 ^a	2.22±0.57 ^b	2.08±1.47 ^b
Liver (g)	0.82±0.06 ^b	1.44±0.21 ^a	1.22±0.03 ^a	1.36±0.21 ^a	1.28±0.06 ^a	1.25±0.28 ^a

¹⁾Weight gain (g/12 week)=final body weight (g)-initial body weight (g).

²⁾FER (food efficiency ratio)=weight gain (g)/ food intake calories (g).

Normal control, no treatment group; infection control, LP-BM5 MuLV infection group; positive control, LP-BM5 MuLV infection with dietary supplement of red ginseng 200 mg/kg; CL50, LP-BM5 MuLV infection with dietary supplement of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts 50 mg/kg; CL200, LP-BM5 MuLV infection with dietary supplement of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts 200 mg/kg; CL500, LP-BM5 MuLV infection with dietary supplement of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts 500 mg/kg. All data are presented as mean±standard deviation (n=8). Differences in the same row were considered statistically significant at $P < 0.05$.

군과 유의적인 차이를 보이지 않았지만 CL500은 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$). 림프질의 무게 변화 또한 감염대조군(4.71 ± 0.87 g)에서 정상대조군(0.06 ± 0.01 g)과 비교하여 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). CL50은 감염대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았지만 양성대조군, CL200, CL500은 유의적으로 무게가 감소되었음을 관찰하였다($P<0.05$). 간의 무게 변화는 정상대조군과 비교하여 감염대조군에서 유의적으로 무게가 증가되었으며, 양성대조군과 울금 20% 주정 추출물 식이투여 모든 군에서 감염대조군과의 유의적인 차이를 보이지 않았다($P<0.05$). 이러한 조직 무게의 변화와 함께 몸무게의 변화도 나타났다. 정상대조군과 비교하여 LP-BM5 MuLV에 감염된 모든 군에서 몸무게와 식이효율이 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과에서 울금 20% 주정 추출물의 고농도는 LP-BM5 MuLV에 감염으로 인한 비장과 림프질의 비대증을 억제시켰음을 알 수 있었다.

T 세포 및 B 세포 증식능 측정

HIV의 gp120은 CD4와 높은 친화력을 가져 $CD4^+$ Th 세포, 대식세포, 수지상세포와 결합하여 세포 내로 들어가 세포의 기능을 떨어뜨리고 바이러스 복제를 증가시킨다(18). 또한 CD21 단백질을 감소시켜 B 세포의 정상적인 기능을 상실시켜 불필요한 항체를 과량으로 생산하여 결과적으로 기회 감염에 대한 반응 능력을 감소시킨다(19). Moir 등(20)의 연구에서 HIV 감염에 의하여 T 세포 및 B 세포의 수가 비감염군에 비하여 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 이러한 면역세포 수 감소에 대한 기전은 정확하게 밝혀지지 않았지만 apoptosis에 의한 것으로 알려져 있다(21,22). 본 연구에서는 T 세포와 B 세포의 증식능을 측정하여 LP-BM5 MuLV 감염에 따른 변화를 관찰하고 울금 주정 추출물의 효능을 평가하였다.

T 세포 및 B 세포 증식능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. T 세포와 B 세포 증식능 모두 정상대조군과 비교하여 감염

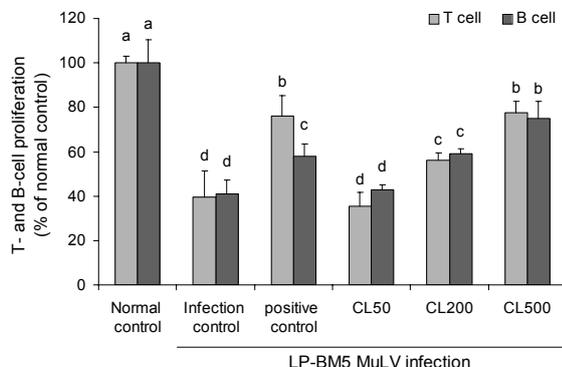


Fig. 1. Effects of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on T and B cell proliferation from primary splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 MuLV infection. Groups are the same as Table 1. Differences among group were considered statistically significant at $P<0.05$.

대조군(T 세포: $39.39\pm 11.97\%$, B 세포: $40.82\pm 6.33\%$)에서 유의적인 감소를 보였다($P<0.05$). 울금 20% 주정 추출물의 식이 투여군은 농도 의존적으로 T 세포와 B 세포 모두 증식능이 감염대조군과 비교하여 유의적으로 높아졌음을 관찰하였다($P<0.05$). Li와 Liu(23)는 커큐민이 마우스의 비장 림프구에서 T 세포의 증식능을 억제하여 면역조절에 효능이 있다고 발표하였다. 울금의 대표 성분인 커큐민의 이러한 효능에 의하여 본 연구에서도 농도 의존적인 효능을 보인 것이라고 예상된다. 따라서 울금 20% 주정 추출물은 LP-BM5 MuLV 감염으로 감소된 T 세포와 B 세포의 증식능을 억제하여 면역조절에 긍정적인 효능을 미쳤음을 확인할 수 있었다.

Th1/Th2 cytokines 생성 측정

$CD4^+$ Th 세포에는 Th1 type cytokines을 생성하는 Th1 세포와 Th2 type cytokines을 생성하는 Th2 세포가 있다. Th1 type cytokines은 주로 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하며, Th2 type cytokines은 B 세포의 활성을 자극시켜 항체 생산을 증가시킨다. 이러한 Th1/Th2 type cytokines의 상호보완적인 조절에 의하여 면역균형을 유지시킨다(24). 하지만 LP-BM5 MuLV의 감염은 Th1 type cytokines을 감소시키고 Th2 type cytokines을 증가시켜 불균형을 일으키고 면역조절 능력을 떨어뜨리게 된다(25).

Th1 type cytokine 중 $IFN-\gamma$ 는 $CD4^+$ Th 세포의 분화와 대식세포의 기능을 자극시키는 역할을 한다(26). 이러한 $IFN-\gamma$ 의 생성은 감염대조군(169.91 ± 26.06 pg/mL)에서 정상대조군(800.75 ± 40.46 pg/mL)과 비교하여 유의적으로 감소되었다($P<0.05$). 반면 울금 20% 주정 추출물 식이 투여군에서는 유의적으로 증가하였으며, CL500군은 581.24 ± 33.38 pg/mL로 양성대조군(600.36 ± 57.06 pg/mL)과 유의적인 차이가 없을 정도로 증가되었다($P<0.05$). 또 다른 Th1 type cytokine인 IL-2는 $CD4^+$ Th 세포의 증식과 분화에 필요한 cytokine이다(27). 본 연구에서 LP-BM5 MuLV의 감염군(77.90 ± 19.82 pg/mL)은 정상대조군(679.84 ± 49.29 pg/mL)과 비교하여 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$). 하지만 CL200군(161.07 ± 18.35 pg/mL)과 CL500군(183.67 ± 16.04 pg/mL)에서는 감염대조군과 비교하여 유의적으로 증가되었음을 확인할 수 있었다($P<0.05$)(Fig. 2).

Th2 type cytokines인 IL-4와 IL-10 모두 감염대조군(IL-4: 130.76 ± 5.21 pg/mL, IL-10: 624.86 ± 39.76 pg/mL)에서 정상대조군(IL-4: 8.38 ± 2.16 pg/mL, IL-10: 37.98 ± 11.14 pg/mL)과 비교하여 유의적으로 크게 증가하였음을 확인하였다($P<0.05$). 반면 울금 주정 20% 추출물의 식이 투여군은 IL-4의 생산량이 농도 의존적으로 감소시켰으며(CL50: 98.06 ± 13.73 pg/mL, CL200: 71.23 ± 5.75 pg/mL, CL500: 15.60 ± 4.77 pg/mL), IL-10의 생산량에서

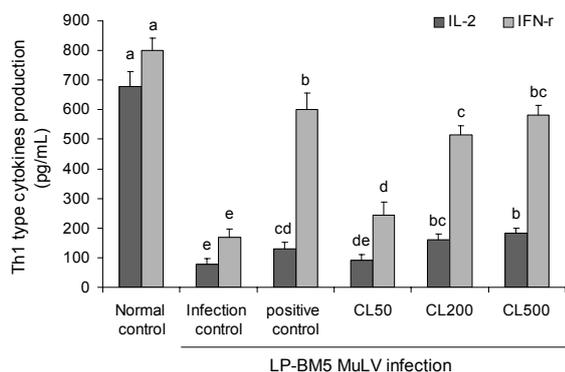


Fig. 2. Effects of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on Th1 type cytokines (IL-2, IFN- γ) production from ConA-stimulated primary splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 MuLV infection. Groups are the same as Table 1. Differences among group were considered statistically significant at $P < 0.05$.

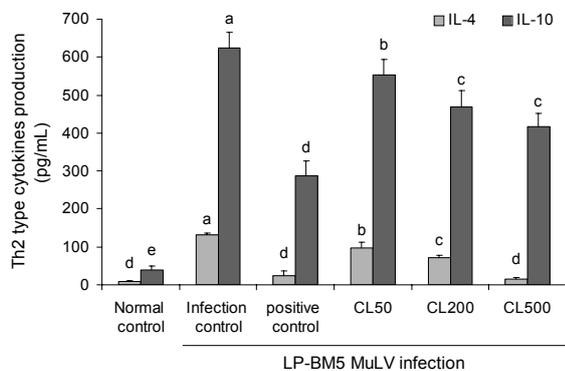


Fig. 3. Effects of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on Th2 type cytokines (IL-4, IL-10) production from ConA-stimulated primary splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 MuLV infection. Groups are the same as Table 1. Differences among group were considered statistically significant at $P < 0.05$.

도 모두 유의적으로 감소시켰으나 CL200군(469.35 ± 42.73 pg/mL)과 CL500군(417.96 ± 32.91 pg/mL)의 유의적인 차이를 보이지 않았다($P < 0.05$)(Fig. 3). 이러한 울금 20% 주정 추출물의 Th2 type cytokines 감소 결과는 Th1 type cytokines 감소를 억제시킴으로써 Th1/Th2의 불균형을 감소시켜 면역 항상성 유지에 도움을 주는 것으로 해석된다.

혈중 면역글로불린 측정

최근 HIV 감염과 B 세포와의 연관성에 관련된 연구에 의하면, HIV의 감염에 의하여 B 세포의 교체(turn over)가 증가하여 형질세포(plasma cell)의 생존기간이 짧아지게 되어 불필요한 혈중 면역글로불린이 증가하게 된다고 밝혔다. HIV가 B 세포의 CD21 단백질의 감소를 시킴으로써 B 세포의 정상적인 기능을 방해하는 것으로 알려져 있다(19). 본 연구에서는 혈중 IgG의 농도를 측정하여 LP-BM5 MuLV의 감염으로 일어나는 고감마글로불린혈증에 울금 20% 주정 추출물이 미치는 영향을 살펴보았다.

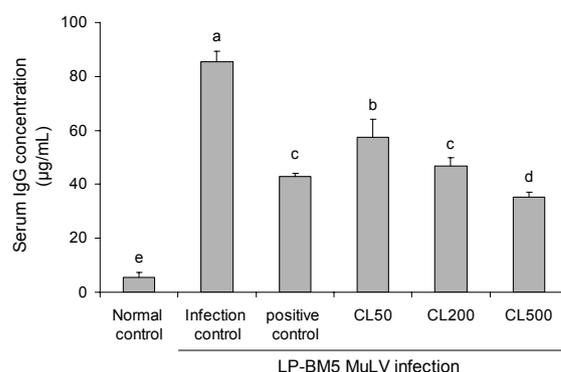


Fig. 4. Effects of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on Immunoglobulin G concentration from blood prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 MuLV infection. Groups are the same as Table 1. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

혈중 IgG 농도를 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 정상대조군(5.44 ± 1.84 µg/mL)과 비교하여 감염대조군(85.49 ± 3.81 µg/mL)에서 유의적으로 크게 IgG의 농도가 증가되었음을 확인하였다($P < 0.05$). 하지만 울금 20% 주정 추출물의 식이 투여는 농도 의존적으로 IgG의 농도를 감소시켰다($P < 0.05$). 이러한 결과는 LP-BM5 MuLV의 감염으로 인한 B 세포의 비정상적인 기능을 울금 20% 주정 추출물이 억제시켜 혈중 면역글로불린의 농도를 억제시켰다고 볼 수 있다.

Pro-inflammatory cytokines 생성 측정

Pro-inflammatory cytokines인 TNF- α 와 IL-6는 NF- κ B를 활성화시켜 HIV의 복제를 야기한다. TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되며, 염증반응을 유도하고 apoptosis를 일으키므로 면역세포 활성 조절에 중요한 cytokine이다(28). 본 연구에서 LP-BM5 MuLV의 감염(311.35 ± 29.96 pg/mL)으로 TNF- α 의 생성량이 정상대조군(47.60 ± 7.61 pg/mL)과 비교하여 유의적으로 증가되었음을 살펴볼 수 있었다($P < 0.05$). 뿐만 아니라 TNF- α 에 의하여 증가되는 IL-6의 생성량도 정상대조군(515.09 ± 10.93 pg/mL)에 비하여 감염대조군($1,013.26 \pm 15.90$ pg/mL)에서 유의적으로 증가하였음을 확인하였다($P < 0.05$). 울금 20% 주정 추출물의 식이 투여는 감염대조군과 저농도에서 TNF- α 와 IL-6 모두 유의적인 차이를 보이지 않았으나, CL200군(TNF- α : 253.90 ± 31.71 pg/mL, IL-6: 886.50 ± 15.58 pg/mL)과 CL500군(TNF- α : 180.28 ± 15.20 pg/mL, IL-6: 823.88 ± 17.05 pg/mL)에서 농도 의존적으로 생성량을 감소시켰다($P < 0.05$)(Fig. 5). Yue 등(29)은 울금에서 추출한 다당류가 인간 말초 혈액 단핵구에서의 TNF- α , IL-6 등의 cytokines의 분비를 조절하여 면역조절 활성능이 있다고 보고하였다. 또한 Chan(30)의 연구에서는 울금의 커큐민이 인간 대식세포에서 LPS에 의하여 유도된 TNF- α 의 생성을 감소시켰다고 보고하였다. 이러한 연구들에 의하여 울금에 포함된 다당류 및 커큐민 등의 물질이 cytokines

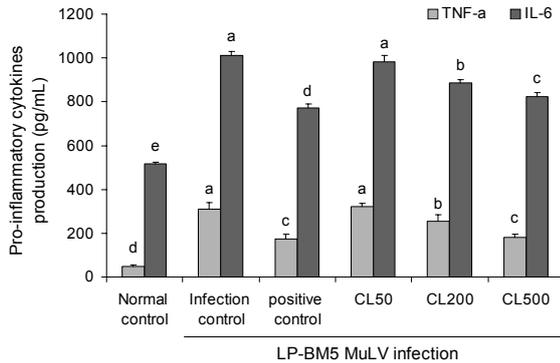


Fig. 5. Effects of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) production from LPS-stimulated primary splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 MuLV infection. Groups are the same as Table 1. Differences among group were considered statistically significant at $P < 0.05$.

의 분비를 조절하여 면역체계의 정상화를 도왔음을 알 수 있다.

IL-15와 IL-12의 생성과 YAC-1에 대한 NK 세포 활성 측정

NK 세포는 내재면역에서 virus에 감염된 세포, 종양세포, 비정상 세포를 인지하여 죽이는 역할을 하며, IL-12와 IL-15 등의 cytokines에 의하여 활성이 자극되어 IFN- γ 등의 분비를 증가시킨다. NK 세포는 활성신호와 억제신호를 가짐으로써 virus에 감염된 세포와 결합하여 활성 신호를 받아 세포를 공격하게 된다(31). 그러나 HIV의 감염은 IL-12의 생성을 손상시켜 NK 세포의 활성이 감소된다. 이로 인하여 virus 감염에 대한 정상적인 세포 공격이 손상되어 NK 세포의 HIV의 감염에 대한 활성이 억제된다(32). 본 연구 결과에서도 LP-BM5 MuLV에 감염된 마우스 비장의 NK 세포의 활성이 유의적으로 감소되었음을 확인하였다 ($P < 0.05$)(Fig. 6). 뿐만 아니라 NK 세포의 활성을 자극시키는 IL-12와 IL-15의 생성량에서도 감염대조군(IL-12: 15.26 ± 2.27 pg/mL, IL-15: 36.14 ± 1.38 pg/mL)이 정상대조군(IL-12: 24.34 ± 3.83 pg/mL, IL-15: 47.72 ± 5.74 pg/mL)과 비교하여 유의적으로 감소되었다($P < 0.05$)(Fig. 7). 반면 울금 20% 주정 추출물 식이 투여한 CL200군($65.60 \pm 6.25\%$)과 CL500군($72.94 \pm 2.57\%$)은 감염대조군($47.90 \pm 2.22\%$)에 비교하여 유의적으로 NK 세포 활성이 증가되었음을 확인하였다($P < 0.05$)(Fig. 6). 또한 울금 20% 주정 추출물의 고농도 식이 투여에 의하여 IL-12와 IL-15의 생성량도 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$)(Fig. 7). 이러한 결과에 의하여 LP-BM5 MuLV 감염에 의하여 감소된 IL-12와 IL-15의 생성량을 울금 20% 주정 추출물이 증가시켜 NK 세포 활성을 증가시키므로써 IFN- γ 를 증가시켰음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 LP-BM5 MuLV 감염에 의하여 면역조절 능력이 결핍된 MAIDS 모델에서 울금 20% 주정 추출물의

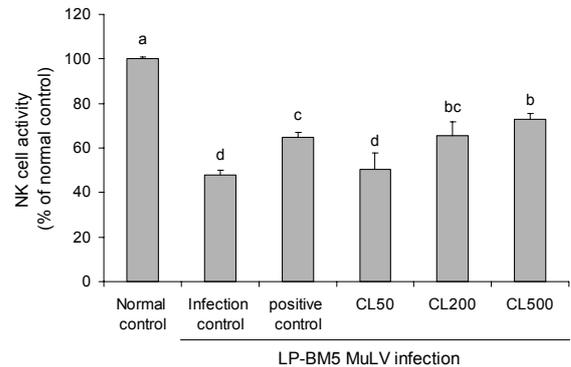


Fig. 6. Effects of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on the NK cell activity by splenocyte (effector cell : YAC-1=5:1) from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 MuLV infection. Groups are the same as Table 1. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

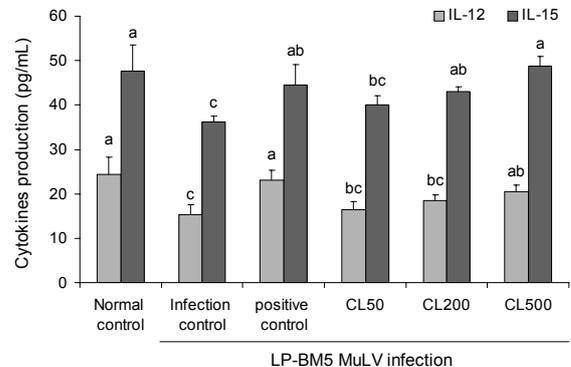


Fig. 7. Effects of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on IL-12 and IL-15 production from LPS-stimulated primary splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 MuLV infection. Groups are the same as Table 1. Differences among group were considered statistically significant at $P < 0.05$.

효능을 확인하였다. 손상된 T 세포, B 세포 및 NK 세포의 기능과 Th1/Th2 cytokines의 불균형을 울금 20% 주정 추출물이 억제시킴으로써 면역조절 효과를 보였으며 이러한 결과는 농도 의존적인 효과를 보였다. 따라서 울금은 면역조절 및 항상성을 유지하는 기능성을 지녔음을 확인하여 천연 면역조절제로서의 개발 가능성을 기대할 수 있다.

요 약

본 연구에서는 울금 20% 주정 추출물이 LP-BM5 MuLV에 감염된 MAIDS 모델에서 면역조절 효과를 확인하기 위해 cytokines 생산, 혈장 면역글로불린 농도, T 세포 및 B 세포의 증식능, NK 세포의 활성능을 측정하였다. 그 결과 LP-BM5 MuLV 감염으로 인하여 감소된 T 세포 및 B 세포의 증식능, NK 세포의 활성능을 울금 20% 주정 추출물 식이 투여가 증가시켰으며, Th1 type cytokines(IL-2, IFN- γ)의 생성량을 증가시키고 Th2 type cytokines(IL-4, IL-10)은 억제시킴으로써 Th1/Th2 type cytokine 발현을 조절하여

면역 항상성을 유지하는 효과를 보였다. 따라서 울금은 면역 조절 효과를 가진 천연 기능성 소재로서의 가능성을 기대할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 기술사업화지원사업에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Tomasi TB Jr, Tan EM, Solomon A, Prendergast RA. 1965. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J Exp Med* 121: 101-124.
2. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. 2007. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 7: 52-63.
3. 2013 Health functional food market trends and consumer survey. 2014. Korea Health Supplements Association. Seongnam, Korea.
4. Piot P, Bartos M, Ghys PD, Walker N, Schwartländer B. 2001. The global impact of HIV/AIDS. *Nature* 19: 968-973.
5. Jolicoeur P. 1991. Murine acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS): an animal model to study the AIDS pathogenesis. *FASEB J* 5: 2398-2405.
6. Li W, Green WR. 2006. The role of CD4 T cells in the pathogenesis of murine AIDS. *J Virol* 80: 5777-5789.
7. Lee JM. 2006. Dehydroepiandrosterone sulfate inhibited immune dysfunction induced by LP-BM5 leukemia retrovirus infection through regulating Th1/Th2 type cytokine mRNA expression and oxidative stress in murine AIDS model. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1329-1335.
8. Iida R, Saito K, Yamada K, Basile AS, Sekikawa K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Seishima M, Nabeshima T. 2000. Suppression of neurocognitive damage in LP-BM5-infected mice with a targeted deletion of the TNF-alpha gene. *FASEB J* 14: 1023-1031.
9. Rodriguez AR, Hodara V, Murthy K, Morrow L, Sanchez M, Bienvenu AE, Murthy KK. 2014. T cell interleukin-15 surface expression in chimpanzees infected with human immunodeficiency virus. *Cell Immunol* 288: 24-30.
10. Greenspan HC, Aruoma OI, Arouma O. 1994. Could oxidative stress initiate programmed cell death in HIV infection? A role for plant derived metabolites having synergistic anti-oxidant activity. *Chem Biol Interact* 91: 187-197.
11. Kim MS, Chun SS, Kim SH, Choi JH. 2012. Effect of tumeric (*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.
12. Selvam R, Subramanian L, Gayathri R, Angayarkanni N. 1995. The anti-oxidant activity of tumeric (*Curcuma longa*). *J Ethnopharmacol* 47: 59-67.
13. Chainani-Wu N. 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 9: 161-168.
14. Varalakshmi Ch, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Srivastava RM, Singh S, Khar A. 2008. Immunomodulatory effects of curcumin: *in-vivo*. *Int Immunopharmacol* 8: 688-700.
15. Liang B, Jiang S, Zhang Z, Inserra P, Lee J, Solkoff D, Watson RR. 2001. Anti-inflammatory effects of theophylline: modulation of immune functions during murine leukemia virus infection. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23: 307-319.
16. Liang B, Wang JY, Watson RR. 1996. Murine AIDS, a key to understanding retrovirus-induced immunodeficiency. *Viral Immunol* 9: 225-239.
17. Odeleye OE, Eskelson CD, Watson RR. 1992. Changes in hepatic lipid composition after infection by LP-BM5 murine leukemia virus causing murine AIDS. *Life Sci* 51: 129-134.
18. Dimitrov DS, Norwood D, Stantchev TS, Feng Y, Xiao X, Broder CC. 1999. A mechanism of resistance to HIV-1 entry: inefficient interactions of CXCR4 with CD4 and gp120 in macrophages. *Virology* 259: 1-6.
19. Moir S, Malaspina A, Li Y, Chun TW, Lowe T, Adelsberger J, Baseler M, Ehler LA, Liu S, Davey RT Jr, Mican JA, Fauci AS. 2000. B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med* 192: 637-646.
20. Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, Posada JG, Kardava L, O'Shea MA, Kottlil S, Chun TW, Proschan MA, Fauci AS. 2010. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood* 116: 5571-5579.
21. Gougeon ML, Lecoer H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L. 1996. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 156: 3509-3520.
22. Morris L, Binley JM, Clas BA, Bonhoeffer S, Astill TP, Kost R, Hurley A, Cao Y, Markowitz M, Ho DD, Moore JP. 1998. HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J Exp Med* 188: 233-245.
23. Li X, Liu X. 2005. Effect of curcumin on immune function of mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25: 137-140.
24. Powrie F, Coffman RL. 1993. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol Today* 14: 270-274.
25. Meyaard L, Schuitemaker H, Miedema F. 1993. T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function? *Immunol Today* 14: 161-164.
26. Biswas P, Poli G, Kinter AL, Justement JS, Stanley SK, Maury WJ, Bressler P, Orenstein JM, Fauci AS. 1992. Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells. *J Exp Med* 176: 739-750.
27. Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, Vallelian F, Bart PA, Pantaleo G. 2005. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7239-7244.
28. Fernández-Ortega C, Dubed M, Ramos Y, Navea L, Alvarez G, Lobaina L, López L, Casillas D, Rodríguez L. 2004. Non-induced leukocyte extract reduces HIV replication and TNF secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1075-1081.
29. Yue GG, Chan BC, Hon PM, Kennelly EJ, Yeung SK, Cassileth BR, Fung KP, Leung PC, Lau CB. 2010. Immunostimulatory activities of polysaccharide extract isolated from *Curcuma longa*. *Int J Biol Macromol* 47: 342-347.

30. Chan MM. 1995. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol* 49: 1551-1556.
31. Yoshikai Y, Nishimura H. 2000. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes Infect* 2: 381-389.
32. Peacock CD, Price P. 1999. The role of IL-12 in the control of MCMV is fundamentally different in mice with a retroviral immunodeficiency syndrome (MAIDS). *Immunol Cell Biol* 77: 131-138.