

을금 주정 추출물이 자연살해세포와 T 면역세포에 미치는 영향

하예진¹ · 김옥경¹ · 남다은¹ · 김용재² · 김은² · 전우진³ · 이정민^{1,4}

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

Effects of *Curcuma longa* L. Extracts on Natural Killer Cells and T Cells

Yejin Ha¹, Ok-Kyung Kim¹, Da-Eun Nam¹, Yongjae Kim²,
Eun Kim², Woojin Jun³, and Jeongmin Lee^{1,4}

¹Department of Medical Nutrition and ⁴Clinical Nutrition Institute, Kyung Hee University

²Korea INSPHarm Research Institute

³Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

ABSTRACT The present study investigated the immunomodulatory effects of *Curcuma longa* L. ethanol extracts on natural killer (NK) cells and T cells. We treated *Curcuma longa* L. ethanol extracts at concentrations of 20, 50, 100, and 150 µg/mL to murine NK cells co-incubated with YAC-1 cells. *Curcuma longa* L. ethanol extracts resulted in increased NK cell activity compared to the control group at all concentrations. In the groups treated with *Curcuma longa* L. ethanol extracts, CD69 and IFN-γ expression levels significantly increased compared to the control group at 100 and 150 µg/mL. In addition, *Curcuma longa* L. ethanol extracts induced significant elevation of CD8+ T cell numbers in a dose-dependent manner. However, *Curcuma longa* L. ethanol extracts also led to reduction of CD4+ T cell and MHC II numbers. The findings of this study suggest that *Curcuma longa* L. ethanol extracts could enhance the immune response through activation of NK and cytotoxic T cells due to a proliferative shift of antigen presentation from MHC II to MHC I, presumably.

Key words: *Curcuma longa* L., NK cell, T cell, immunomodulating activity

서론

인체의 면역계는 외부로부터 침입한 병원균 등의 유해물질로부터 신체를 보호하기 위한 방어 체계로서 유해물질을 제거하고 심각한 염증을 줄이는 항상성 유지에 의하여 균형을 이룬다(1-3). 면역 체계는 크게 물리적 장벽, 내재면역, 적응면역으로 3차 방어선을 지니고 있다. 상피조직, lysozyme, protease, normal flora 등에 의한 1차 방어선에서 제대로 병원균을 방어하지 못하면 대식세포(macrophage), 비만세포(mast cell), 자연살해세포(natural killer cell, NK cell), 보체(complement system)에 의한 2차 방어선인 내재면역이 활성화된다. 내재면역에 의해 제거되지 못한 항원은 3차 방어선인 적응면역을 활성화시켜 T 세포, B 세포에 의하여 면역글로불린을 생성 및 사이토카인 분비를 통하여 표적세포(target cell)를 파괴한다(4,5).

내재면역 중 자연살해세포는 감염된 세포나 종양세포 등의 표적세포를 인지하여 결합한 후 독성과립들을 표적세포에 통과시켜 세포사멸을 유도한다(6). 이러한 자연살해세포

는 IFN(interferon)이나 대식세포에서 유래된 사이토카인에 의하여 활성화되며, 활성화된 자연살해세포는 IFN-γ, TNF-α(tumor necrosis factor-α) 등의 사이토카인을 분비하여 종양세포의 세포사멸을 촉진시키거나 다른 면역세포의 활성화에 기여한다(7). 자연살해세포의 활성화는 다양한 활성화 및 억제 수용체가 존재하여 신호전달 균형에 의해 조절되며, 이러한 조절에 의하여 정상세포는 공격하지 않고 감염된 세포를 제거하게 된다. 이러한 특성에 따라 항암연구에서 자연살해세포 활성화와 연관된 연구가 활발히 진행 중이다(8,9).

T 세포는 표적세포의 세포 내의 병원체를 MHC 분자에 결합된 펩티드 항원을 인지함으로써 기능을 달리한다. MHC 분자는 class I 과 class II로 나뉘며 각자 서로 다른 두 종류의 T 세포에 의해 인지된다. MHC II 분자는 CD4+ T 세포가 인지하며, CD4+ T 세포는 Th(T helper cell)1과 Th2가 존재하여 다른 기능을 하게 된다. Th1 세포는 Th1 type 사이토카인을 생성하여 주로 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극한다. Th2 type 사이토카인을 생성하는 Th2 세포는 B 세포의 활성을 자극해 항체 생산을 증가시키는 역할을 한다. 이러한 Th1/Th2 type cytokines의 상호보완적인 조절에 의하여 면역 균형을 유지시킨다. 반면 MHC I 분자를 발현시킨 표적세포는 CD8+ T 세포가 인지하여

Received 3 November 2014; Accepted 13 February 2015

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

세포사멸을 유도한다. 따라서 T 세포는 적응면역의 체액 매개 반응과 세포 매개 반응 모두에서 중요한 역할을 한다 (10-12).

인체의 면역반응은 균형을 이루어 조절이 정상적으로 되어야 건강을 유지할 수 있으므로 면역조절 능력은 질병 예방과 치료에 중요시된다. 산업화, 환경오염, 고령화 등 다양한 원인에 의하여 면역 질환 유병률이 증가하고 있으며 면역력 저하 인구도 급증하고 있다. 이에 따라 면역력 증가에 대한 관심이 증가하고 있으며 관련 연구도 활발히 진행되고 있다. 최근에는 면역 질환의 치료방법 한계성 및 예방의학의 부족으로 자연스럽게 건강기능식품에 대한 관심이 고조되었으며, 특히 천연물의 효능 입증에 다양하게 이루어지고 있다 (13,14). 본 연구실에서는 LP-BM5 MuVL 감염 모델에서의 울금(*Curcuma longa* L., tumeric) 추출물의 면역조절에 관한 연구를 진행한 바 있으며 긍정적인 효능을 지녔음을 확인하였다(15). 울금은 생강과에 속하는 식물로 노란색 향신료로 사용할 뿐만 아니라 염료와 식품의 착색제로도 사용되고 있다. 중국, 인도, 일본 등 아시아 국가에서 널리 재배하고 있으며 항산화 효과(16), 항염(17), 면역조절(18) 등의 다양한 생리활성에 대해 보고되었다. 본 연구에서는 울금 주정 추출물이 자연살해세포와 T 세포에 미치는 영향을 관찰하여 면역조절 효과에 대해 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 울금은 한국인스팜(주)(Hwasun, Korea)에서 제공받았다. 전라남도 진도에서 재배한 울금을 분말화하여 시료를 20% 에탄올에 첨가하여 4시간 동안 95°C에서 환류 추출하였으며, 여과지(Whatman filter paper No. 6, Whatman, Newton, MA, USA)를 이용하여 여과하였다. 여과액을 회전진공농축기로 감압 농축하였으며, 분무 건조하여 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

동물처리

본 실험에서는 6주령인 Balb/C female 마우스를 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 온도는 23±2°C, 상대습도는 50±5%, 명암은 12시간(light/dark cycle)인 조건에서 1주간 적응 후 실험에 사용하였다. 식이는 AIN 93G를 공급하였으며 실험기간 동안 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 연구에 사용한 실험동물은 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다 (KHUASP(SE)-14-026).

세포배양

본 실험에서 사용된 YAC-1 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받았다. 10% fetal bovine serum(Hyclone Laborato-

ries, Logan, UT, USA), 2 mmol/L glutamine(Hyclone Laboratories), 100 mg/L penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories)을 첨가한 RPMI 1640(Hyclone Laboratories)을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건인 incubator에서 배양하였다.

자연살해세포 분리

마우스에서 분리한 비장을 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories), 2 mmol/L glutamine(Hyclone Laboratories), 100 mg/L penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories)을 첨가한 RPMI-1640(Hyclone Laboratories)으로 세척하고 0.45 µm cell strainer를 사용하여 세포 부유액을 만들었다. Red blood cell lysing buffer(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈시켜 만든 비장세포 부유액을 mouse NK cell enrichment kit(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada)을 사용하여 자연살해세포를 분리하였다.

자연살해세포 활성 측정

효과세포로 이용하기 위하여 자연살해세포를 96 well plate에 1×10⁵ cell/well씩 분주하였다. YAC-1 세포를 표적세포로 하여 각 well에 effector 세포와 표적세포의 비율을 5:1로 조정하여 분주하였으며, 동시에 울금 20% EtOH 추출물을 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL로 처리하였다. 4시간 동안 incubation 후 cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay kit(Promega Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 흡광도 490 nm에서 lactate dehydrogenase(LDH)를 측정하여 YAC-1 세포의 cytotoxicity를 계산함으로써 자연살해세포의 활성도를 측정하였다.

단백질 추출 및 western blot 측정

자연살해세포를 6 well plat에 1×10⁶ cells/well씩 분주하였으며, 울금 20% EtOH 추출물을 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL로 처리하였다. 24시간 동안 incubation 시킨 후 harvest 하여 1,000 rpm에서 원심분리하였다. 세포 pellet만 남긴 다음 protease inhibitor cocktail이 포함된 cell lysis reagent(Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 ice에 1시간 방치한 후 상층액을 회수하여 -20°C에 보관하였다. 이렇게 얻어진 세포 단백질은 10% polyacrylamide gel에 120 V에서 1시간 30분 동안 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane(Whatman, Dassel, Germany)에 transfer 시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% skim milk(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 1시간 동안 blocking 시킨 후 1,000배 희석된 β-actin(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), CD69(Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Germany), CD335(Bioss, Woburn, MA, USA) 일차 항체를 24시간 반응시켰다. 5,000배 희석된

anti-rabbit secondary 항체(antirabbit IgG HRP-linked antibody, Cell Signaling Technology)를 1시간 동안 반응시킨 후, ECL(Pierce, Milwaukee, WI, USA)을 처리하고 ChemiDoc imaging system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 이미지를 얻었다.

mRNA 분리 및 real-time PCR

자연살해세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/well씩 분주하였으며 울금 20% EtOH 추출물을 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$ 처리하여 24시간 동안 incubation 하였다. 1% β -mercaptoethanol이 포함된 RLT(lysis buffer, Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 균질화한 후 RNeasy extraction kit(Qiagen)을 사용하여 mRNA 추출을 하였다. cDNA 합성을 위하여 각 1 μL 의 RNA를 사용하여 iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad Laboratories)으로 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories)을 사용한 실시간 정량 PCR(real time quantitative PCR)을 하였다. 기기는 real-time PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 유전자의 PCR primer는 Tm(melting temperature) 값을 55°C 부근으로 정하였으며, 각 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', TNF- α : forward primer 5' CAC AAG ATG CTG GGA CAG TGA 3', reverse primer 5' TCC TTG ATG GTG GTG CAT GA 3', IFN- γ : forward primer 5' TTG GCT TTG CAG CTC TTC CT 3', reverse primer 5' TGA CTG TGC CGT GGC AGT A 3'. Real-time PCR에는 cDNA 2 μL 와 2X SYBR mix 10 μL , forward, reverse primer는 100 pmol/ μL 로 각각 1 μL 씩 첨가하여 나머지는 H₂O로 총 20 μL 로 맞추어 주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR 증폭은 40 cycle로 실시하였다. 증폭 단계는 denaturation을 95°C 에서 15초, annealing을 55°C 에서 1분, extension을 72°C 에서 30초를 반복하였다. 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었으며 모든 cycle이 완료된 후 melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Applied Biosystems(Foster City, CA, USA)에서 제공하는 One step system software v2.1로 분석하였다.

Flow cytometry

자연살해세포를 24 well plate에 1×10^6 cells/well씩 분주하였으며, 울금 20% EtOH 추출물을 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였다. 48시간 동안 incubation 후 anti-mouse MHC class II FITC(eBioscience, San Diego, CA, USA)와 anti-mouse CD8a FITC (eBioscience), anti-mouse CD4 PE(eBioscience)를 각각 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 ice에서 암실에서 30분간

방치하였다. 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 세포 pellet을 FACS buffer($1 \times$ PBS, 1% BSA, 0.1% sodium azide)에 부유시켜 FACStar plus(Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 측정하였다.

통계처리

본 실험은 SPSS(statistical package for social science version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 사용하였다. 각 실험군의 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였으며, 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 실험군 간에 유의성을 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

울금 20% 주정 추출물이 자연살해세포 활성화에 미치는 영향

자연살해세포는 다른 면역계 세포들보다 원형질이 풍부하고 크기가 크며 원형질 안에 큰 과립을 가지고 있는 림프구양세포이다. 자연살해세포는 과거에 감각(sensitization)을 받은 적이 없는 상태에서도 활성화되어 반응하기 때문에 여러 종류의 병인에 대한 인체 방어능의 제일선을 담당한다(19). 특히 내재면역을 담당하는 세포로 암 또는 감염 질환에서 생체의 초기 면역 방어에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(20). 평상시에는 활성을 띠고 있지 않지만 적절한 표적물질과 접촉하게 되면 활성화되어 표적세포를 파괴한다. 자연살해세포는 바이러스와 같은 병원균이 체내에 들어와 복제를 위해 숙주세포 내로 침투하는 것을 막거나 침투된 세포를 선택적으로 찾아 제거한다(21). 자연살해세포가 파괴할 수 있는 대상은 매우 다양하지만 이들 중 가장 널리 자연살해세포 활성화에 이용되고 있는 세포는 쥐의 경우 Moloney virus-induced lymphoma 세포주인 YAC-1 세포이다(22). 본 연구에서는 자연살해세포와 YAC-1 세포를 함께 배양하여 활성화를 자극시켜 울금 20% 주정 추출물의 처리가 자연살해세포 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

울금 20% 주정 추출물을 처리하지 않은 control군에서는 YAC-1 세포에 대한 사멸 정도가 $21.01 \pm 3.29\%$ 였다. 반면 울금 20% 주정 추출물을 처리한 군들은 control군과 비교하여 모두 유의적으로 높아졌음을 확인하였다. 울금 20% 주정 추출물 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$ 각각 $40.11 \pm 3.24\%$, $55.64 \pm 1.39\%$, $57.62 \pm 1.93\%$, $59.42 \pm 1.06\%$ 의 활성을 보였다. 농도 의존적인 결과를 보이지는 않았으나 울금 20% 주정 추출물을 처리한 군들 중에서 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적으로 가장 낮은 활성을 보였고, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$ 는 군 간 유의적인 차이가 없이 가장 높은 활성을 보였다($P < 0.05$)(Fig. 1).

See 등(23)의 연구에서는 인삼 추출물이 자연살해세포의 기능 향상에 영향을 미쳤음을 확인하였고 이는 인삼 추출물의 처리 농도가 높을수록 자연살해세포의 활성이 증가되었

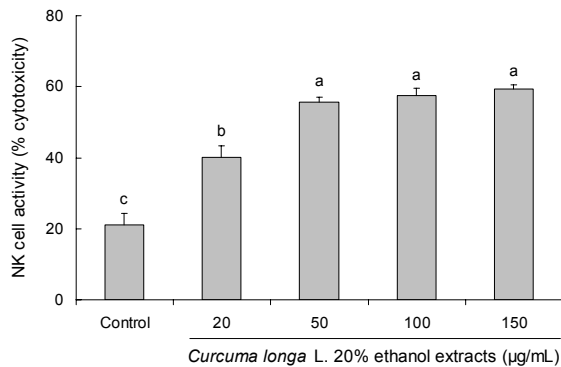


Fig. 1. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on NK cell activity. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

다. 본 연구에서 확인한 울금의 효능은 인삼의 효능과 마찬가지로 자연살해세포의 활성을 도움으로써 종양세포 제거에 긍정적으로 기여하였음을 확인할 수 있었다.

울금 20% 주정 추출물이 자연살해세포의 CD69와 CD335 발현에 미치는 영향

CD69는 T 세포나 자연살해세포의 활성화 상태에서 발현되는 분자로 자연살해세포의 활성화 후 짧은 시간에 빠르게 발현된다(24). 따라서 본 연구에서는 자연살해세포의 활성화를 확인하기 위하여 YAC-1 세포와 함께 배양한 자연살해세포에서 울금 20% 주정 추출물의 처리가 CD69 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. Control군의 CD69 발현이 $100\pm 5.74\%$ 였을 때 울금 20% 주정 추출물을 처리한 군들은 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL 각각 $110.67\pm 8.48\%$, $108.58\pm 5.63\%$, $117.77\pm 5.30\%$, $139.26\pm 5.61\%$ 의 CD69 단백질 발현을 보였다. 20 µg/mL와 50 µg/mL의 처리군은 control과 유의적인 차이를 보이지 않았지만 100 µg/mL, 150 µg/mL 처리군에서는 유의적으로 높아졌음을 확인하였고, 이는 농도 의존적인 결과를 나타내었다($P<0.05$)(Fig. 2).

CD335는 NKp46 또는 NCR1이라고도 알려져 있으며 이는 자연살해세포가 활성화되었을 때뿐만 아니라 휴식기(resting) 상태에서도 발현이 되어 있다고 알려져 있다(25, 26). 본 연구에서는 CD335 단백질 발현을 측정함으로써 자연살해세포의 증식능을 간접적으로 측정하였다. Control군의 CD335 발현이 $100\pm 3.09\%$ 였을 때 울금 20% 주정 추출물을 처리한 군들은 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL 각각 $106.99\pm 4.39\%$, $105.73\pm 2.26\%$, $107.65\pm 2.19\%$, $104.99\pm 4.88\%$ 의 CD335 단백질 발현을 보였다. Control과 유의적으로 차이 있는 군은 20 µg/mL와 100 µg/mL이었으나 울금 20% 주정 추출물을 처리한 군들 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다($P<0.05$)(Fig. 2). 위 결과에 따르면 울금 20% 주정 추출물의 처리가 자연살해세포의 증식에

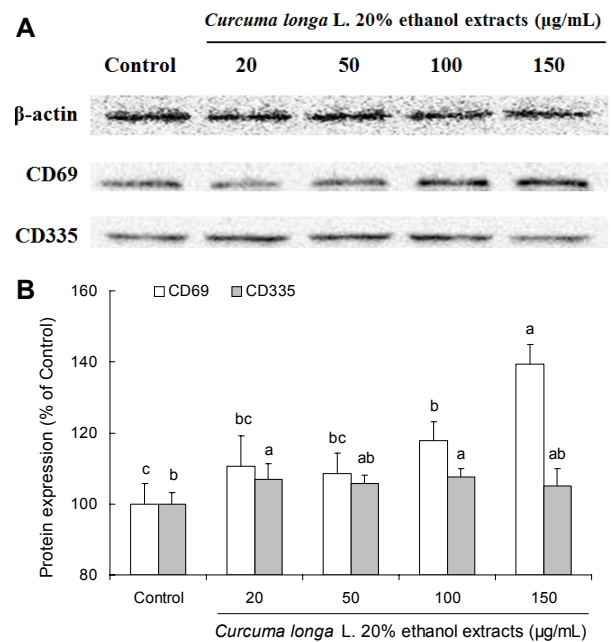


Fig. 2. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on protein expression of CD69 and CD335 in NK cells. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$ on CD69 and CD335, respectively.

는 크게 영향을 미치지 않았으나 활성을 증가시키는 결과를 보였음을 알 수 있다. Yadav 등(27)에 의하면 커큐민의 처리가 자연살해세포의 활성을 증가시켰다고 보고하였으며 이는 IFN- γ (1000 U)를 처리한 그룹보다 더 높은 활성을 보였다. 본 연구에서는 YAC-1 세포에 대한 사멸 효과가 증가되었음을 확인하였으므로 울금은 자연살해세포의 활성을 조절하여 면역조절 효능에 영향을 미친다고 할 수 있다.

울금 20% 주정 추출물이 자연살해세포의 사이토카인 발현에 미치는 영향

여러 사이토카인들은 활성화된 자연살해세포에서 분비되어 염증 반응에 기여하거나 표적세포의 사멸을 유도하게 된다. 자연살해세포가 활성화되면 증가되는 대표적인 사이토카인은 TNF- α 와 IFN- γ 이다(7). 이러한 사이토카인은 염증 반응을 유도하고 T 세포, B 세포, 대식세포, 수지상세포 등의 다른 면역세포의 활성을 자극시켜 표적세포를 제거한다. 따라서 자연살해세포에서 분비한 사이토카인은 내재면역계에서 뿐만 아니라 적응면역계에도 영향을 미친다(28). 본 연구에서는 YAC-1 세포와 함께 배양한 자연살해세포에서 울금 20% 주정 추출물의 처리가 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

TNF- α 의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인하였다. 반면 IFN- γ 의 mRNA 발현에서는 control군(1.00 ± 0.08)과

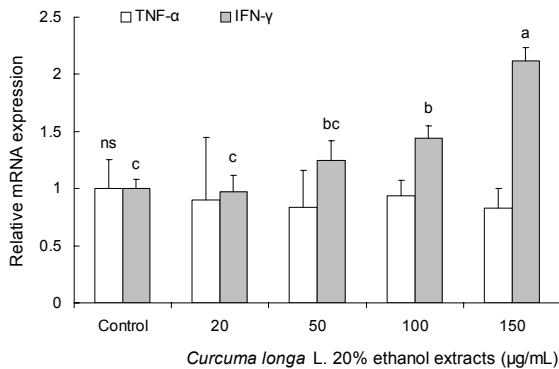


Fig. 3. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on mRNA expression of cytokines in NK cells. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. ns: not significant.

비교하여 울금 20% 주정 추출물 저농도(20 µg/mL, 50 µg/mL)에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 100 µg/mL (1.44±0.10), 150 µg/mL(2.12±0.12)를 처리한 군에서 유의적으로 발현이 증가되었으며, 이는 농도 의존적인 결과를 나타내었다($P < 0.05$)(Fig. 3). 따라서 울금 20% 주정 추출물은 자연살해세포의 활성을 증가시키고 이에 따른 IFN-γ의 발현을 증가시켰음을 확인하였다. IFN-γ는 자연살해세포의 활성 증가뿐만 아니라 대식세포의 활성 등 면역세포의 활성을 증가시킴으로써 항바이러스, 항종양 등의 생리활성을 나타낸다(29). 그러므로 울금은 자연살해세포의 IFN-γ

분비 증가를 유도함으로써 다른 면역세포의 활성을 조절하는 데 도움이 될 수 있으므로 내재면역계에서 뿐만 아니라 적응면역계에 영향을 미칠 수 있을 것이라고 예상된다.

울금 20% 주정 추출물이 T 세포와 MHC II 발현에 미치는 영향

본 연구에서는 울금 20% 주정 추출물이 T 세포에 미치는 영향을 알아보기로 마우스의 비장세포를 분리한 다음 울금 20% 주정 추출물을 처리하여 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포의 비율과 MHC II 발현 변화를 관찰하고자 하였다. Control군에서 CD4+ T 세포는 20.33±0.47%였으나 울금 20% 주정 추출물을 처리한 군들은 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL 각각 24.23±0.33%, 23.20±0.22%, 22.13±0.34%, 20.07±0.33%로 농도가 높아질수록 감소되었음을 확인하였다. 반면 CD8+ T 세포의 경우 control군에서 10.23±0.26으로 유의적으로 가장 낮았다. 울금 20% 주정 추출물을 처리한 군에서는 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL 각각 14.97±0.69%, 13.93±0.17%, 15.20±0.28%, 19.57±0.37%로 나타나 농도가 높아질수록 CD8+ T 세포의 비율이 증가되었음을 확인하였다($P < 0.05$)(Fig. 4). MHC II 발현 변화를 관찰한 결과에서는 정상군에서 37.27±0.21%로 유의적으로 가장 높게 관찰되었다. 반면 울금 20% 주정 추출물을 처리한 군에서는 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL 각각 30.07±0.25%, 29.47±0.37%, 28.73±0.21%, 22.30±0.22%로 농도가 높아질수록 MHC II 발현이 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$)

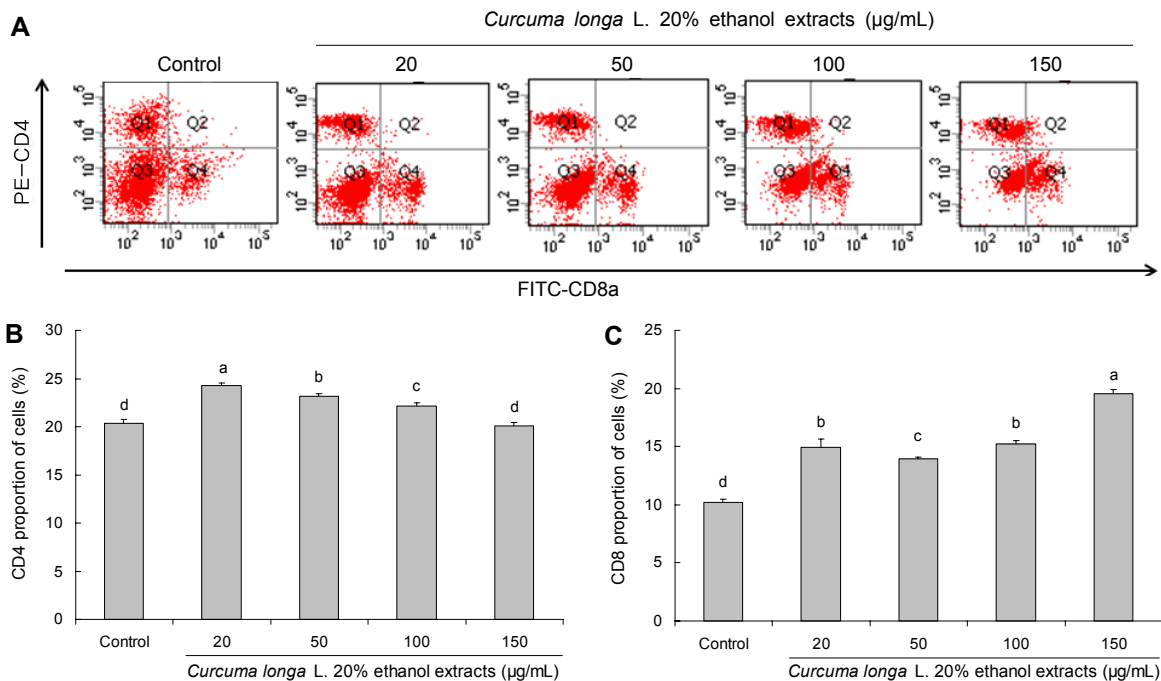


Fig. 4. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on the proportions of CD4+ and CD8 T+ cells in splenocytes. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

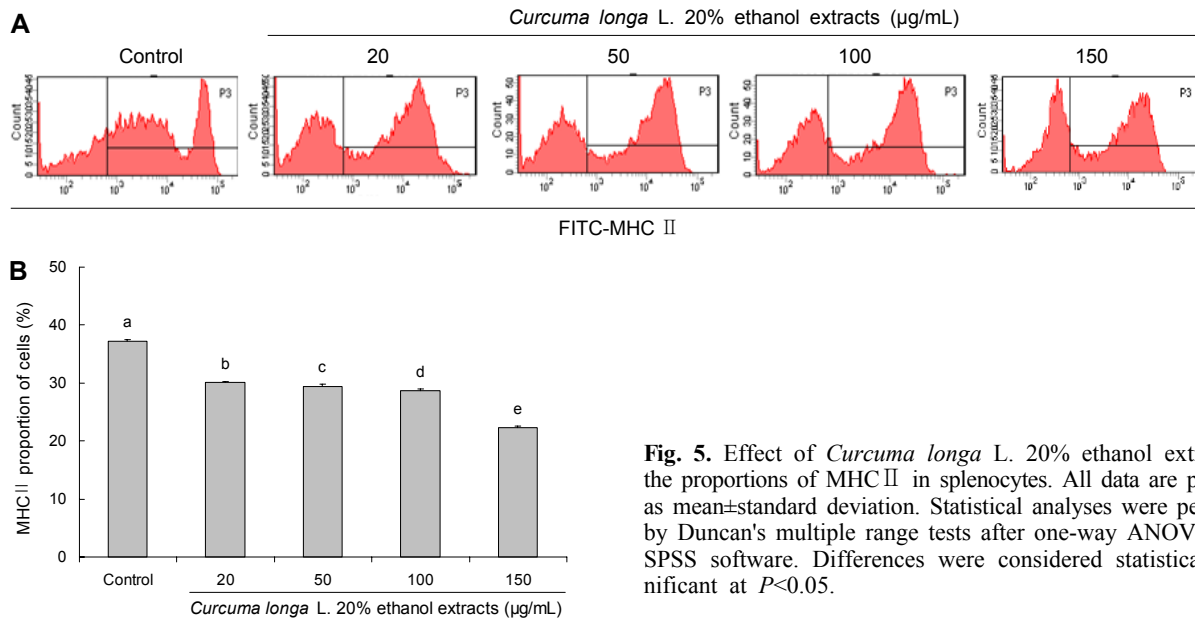


Fig. 5. Effect of *Curcuma longa* L. 20% ethanol extracts on the proportions of MHC II in splenocytes. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

(Fig. 5).

적응면역계 중 T 세포는 인지된 MHC 분자에 따라 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포로 나뉘며 역할을 각각 다르게 수행한다. CD4를 발현하는 성숙한 T 세포는 MHC class II 분자 쪽으로 TCR(T cell receptor) 특이성을 가지며, CD8을 발현하는 T 세포는 MHC class I 분자와 반응하는 TCR을 가진다(10-12). CD4+ T 세포는 T helper 세포로 B 세포와 수지상세포, 대식세포 등과의 상호 작용함으로써 다른 면역 세포들을 활성화시키고 조절하는 역할을 한다(30). CD8+ T 세포는 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell)로 바이러스 등에 감염된 세포나 종양 세포를 파괴한다(31). 따라서 본 연구 결과를 보았을 때 울금 20% 주정 추출물은 상대적으로 MHC II 발현 감소에 의하여 CD4+ T 세포의 비율은 감소되고 CD8+ T 세포의 비율을 증가시켜 효과적으로 세포독성 활동을 수행할 수 있을 것이라고 추측할 수 있다.

결론적으로 본 연구 결과에 의하면 울금 20% 주정 추출물은 자연살해세포의 활성을 증가시켜 효과적으로 종양 세포를 제거할 수 있었으며, CD4+ T 세포보다는 CD8+ T 세포를 증가시킴으로써 감염된 세포나 종양 세포 제거를 효과적으로 할 수 있을 것이라고 예상된다. 따라서 울금 20% 주정 추출물은 내재면역뿐만 아니라 적응면역에도 관여하여 면역조절에 영향을 미친 것으로 보인다. 하지만 본 연구에서 한계점은 MHC I 발현 증가를 직접 확인하기보다는 CD8+ T cells을 통해 간접적으로 확인하였다는 점이며, 감소된 MHC II 발현이 정상적 범위에서 항체 생성에 미치는 영향에 대해서는 향후 연구가 필요한 부분으로 인식된다.

요 약

본 연구에서는 국내에서 재배되는 울금의 면역조절 효과에

대해 평가하고자 20% 주정 추출물을 이용하여 자연살해세포와 T 세포에 미치는 영향을 관찰하였다. 마우스의 비장세포에서 분리한 자연살해세포를 종양세포 YAC-1 세포와 함께 배양시켜 울금 20% 주정 추출물의 처리에 따른 변화를 관찰하였다. 그 결과 울금 20% 주정 추출물의 처리는 자연살해세포의 CD69 발현과 IFN- γ 의 발현을 증가시켰고 결과적으로 활성이 증가되어 YAC-1 세포의 제거를 증가시켰음을 확인하였다. 또한 마우스의 비장세포에서 울금 20% 주정 추출물의 처리에 따른 T 세포의 변화를 관찰한 결과에서는 CD4+ T 세포보다는 CD8+ T 세포를 증가시켰음을 확인하여 감염된 세포나 종양세포 제거를 효과적으로 할 수 있을 것이라고 예상할 수 있었다. 결론적으로 울금 20% 주정 추출물은 내재면역과 적응면역에 영향을 미쳐 면역조절에 긍정적인 변화를 보였음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 기술사업화지원사업에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
- 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.
- Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5: 772-782.
- Liévin-Le Moal V, Servin AL. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota.

- Clin Microbiol Rev* 19: 315-337.
5. Flajnik MF, Du Pasquier L. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol* 25: 640-644.
 6. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17: 189-220.
 7. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. 2012. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 91: 299-309.
 8. Frese-Schaper M, Keil A, Yagita H, Steiner SK, Falk W, Schmid RA, Frese S. 2014. Influence of natural killer cells and perforin-mediated cytolysis on the development of chemically induced lung cancer in A/J mice. *Cancer Immunol Immunother* 63: 571-580.
 9. Li Q, Morimoto K, Nakadai A, Inagaki H, Katsumata M, Shimizu T, Hirata Y, Hirata K, Suzuki H, Miyazaki Y, Kagawa T, Koyama Y, Ohira T, Takayama N, Krensky AM, Kawada T. 2007. Forest bathing enhances human natural killer activity and expression of anti-cancer proteins. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20: 3-8.
 10. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Blüthmann H, von Boehmer H. 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335: 229-233.
 11. Shedlock DJ, Shen H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300: 337-339.
 12. Powrie F, Coffman RL. 1993. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol Today* 14: 270-274.
 13. 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.
 14. Schäfer G, Kaschula CH. 2014. The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Anticancer Agents Med Chem* 14: 233-240.
 15. Kim OK, Yoo SA, Nam DE, Kim Y, Kim E, Jun W, Hwan K, Lee J. 2014. Immunomodulatory effects of *Curcuma longa* L. extract in LP-BM5 murine leukemia viruses-induced murine acquired immune deficiency syndrome. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1317-1324.
 16. Selvam R, Subramanian L, Gayathri R, Angayarkanni N. 1995. The anti-oxidant activity of tumeric (*Curcuma longa*). *J Ethnopharmacol* 47: 59-67.
 17. Chainani-Wu N. 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 9: 161-168.
 18. Varalakshmi Ch, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Srivastava RM, Singh S, Khar A. 2008. Immunomodulatory effects of curcumin: *in-vivo*. *Int Immunopharmacol* 8: 688-700.
 19. Pedersen BK, Ullum H. 1994. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc* 26: 140-146.
 20. Whiteside TL, Herberman RB. 1995. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 7: 704-710.
 21. Lanier LL. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16: 359-393.
 22. Wright SC, Bonavida B. 1983. YAC-1 variant clones selected for resistance to natural killer cytotoxic factors are also resistant to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1688-1692.
 23. See DM, Broumand N, Sahl L, Tilles JG. 1997. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* 35: 229-235.
 24. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R. 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 97: 159-165.
 25. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186: 1129-1136.
 26. Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, Moretta L, Moretta A. 1999. Nkp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of Nkp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 29: 1656-1666.
 27. Yadav VS, Mishra KP, Singh DP, Mehrotra S, Singh VK. 2005. Immunomodulatory effects of curcumin. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27: 485-497.
 28. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331: 44-49.
 29. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189.
 30. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 196: 851-857.
 31. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10: 29-37.