

유자 에탄올 추출물의 면역력 증진 효과

양지원¹ · 전해린² · 유양희³ · 김진영⁵ · 최효경⁴ · 최경철² · 전우진³ · 윤호근¹

¹연세대학교 의과대학, ²울산대학교 의과대학
³전남대학교 식품영양학과, ⁴한국식품연구원, ⁵(주)산들촌

Citrus Ethanol Extracts Promotes Innate Immune Response by Activating NF- κ B

Jiwon Yang¹, Hyelin Jeon², Yang Hee You³, Jin Young Kim⁵, Hyo-Kyoung Choi⁴,
Kyung-Chul Choi², Woo Jin Jun³, and Ho-Geun Yoon¹

¹Yonsei University College of Medicine

²University of Ulsan College of Medicine

³Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

⁴Division of Nutrition and Metabolism Research Group, Korea Food Research Institute

⁵SDCFood Co., Ltd.

ABSTRACT *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka has been traditionally called Yuza in Korea and is used as a cuisine material or tea as well as medicinal herb. In this study, we evaluated the immune-enhancing effect of *Citrus junos* ethanol extract (CJE) on RAW264.7 mouse macrophage and primary immunocytes. CJE treatment showed increased macrophage activity in a dose-dependant manner. CJE also enhanced natural killer (NK) cell activity. We measured lactate dehydrogenase (LDH) level as a measurement of NK cell cytotoxicity against YAC-1 lymphoma cells. CJE treatment showed an increased LDH level in a dose-dependent manner. Finally, we evaluated the effect of CJE on mouse primary splenocyte proliferation. CJE treatment slightly increased splenocyte proliferation compared to the control. The results of this study suggest that CJE can help immune function via macrophage cytokine production, increased NK cell activity, and splenocyte proliferation.

Key words: *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka, immuno-stimulating activity, cytokine, NK cell, RAW264.7 cell

서 론

2000년 이후 전 세계적으로 급성호흡기증후군(SARS), 조류독감, 에볼라 바이러스 등과 같은 급성 신종 전염병들이 등장하면서 이러한 전염병에 대한 인체의 방어능력인 면역력의 중요성이 더욱 대두되고 있다. 인체의 체내 항상성이 깨지거나 병원균의 침입과 같이 위협이 되는 것들에 대한 생체방어력인 면역력은 대식세포나 natural killer(NK) 세포 등이 관련된 비 특이적 면역과 T 세포나 B 세포가 관여하는 특이적 면역으로 분류할 수 있다(1). 병원균이 인체에 침입했을 때 호중구(neutrophile), 단핵구(monocyte), 대식세포(macrophage)와 같은 탐식세포(phagocytes)들은 가장 먼저 인체를 병원균들로부터 방어하는 선천 면역반응의 주요 세포군이다(2). 특히 대식세포는 상피세포 장벽 이후의

생체방어에 있어 최초 대응세포로 항원제시세포(antigen presenting cell)로서의 기능도 수행하며, 적응면역과 관련하여 T 세포 작용에도 영향을 준다(3). 또한 병원균에 감염된 세포나 암세포 등도 제거하고, 면역반응에 기여하는 산화질소(nitric oxide, NO)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 사이토카인(cytokine) 등을 분비하기도 한다(4).

인체의 적응면역이 작동하기 전에 병원균으로부터 신속하게 대응할 수 있는 선천성 면역기능을 담당하는 대식세포의 활성인자를 찾기 위한 천연물질들의 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에는 RAW264.7 대식세포주에서 발효 울금의 면역조절 효과를 보고한 결과가 있었고(4), 생약 추출물을 이용하여 대식세포의 면역증강 효과를 연구한 결과(5)와 사과 씨 에탄올 추출물이 대식세포 면역조절 활성에 미치는 영향에 대한 보고가 있었다(6).

유자(*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka, Yuzu)는 중국, 일본, 한국 등지에서 자생하는 유자나무의 신맛이 강한 과실로, 향미가 좋아 음식의 소스나 유자청으로 만들어져 음용차로도 이용되어 왔다(7). 풍부한 비타민 C와 무기질 및 구연산을 함유한 유자에는 이들 영양소 외에도 플라보노이드 성

Received 30 April 2015; Accepted 13 August 2015

Corresponding author: Ho-Geun Yoon, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 03722, Korea

E-mail: yhgeun@yuhs.ac, Phone: +82-2-2228-1683

분이 심혈관계 질환의 발생률을 감소시키고, 과육과 과피에 함유된 강한 항산화활성 성분은 활성산소인 자유 라디칼(free radical)을 소거시켜 질병에 대한 예방의학적인 활성도 가지고 있다(8).

따라서 본 연구에서는 유자가 인체의 선천성 면역 증강에 도움을 줄 가능성이 있는지를 알아보고자 유자를 30% 주정으로 추출하였고, *in vitro* 상에서 면역 증강의 기전을 알아보기 위한 목적으로 *in vitro* 면역 실험에서 주로 이용되는 마우스의 대식세포 유래 세포주인 RAW264.7을 이용하여 유자 주정추출물이 주는 면역 활성 영향을 평가하였다. 선천성 면역에 미치는 유자 추출물의 영향을 알아보기 위한 연구이므로 면역세포들이 위치하는 보조 면역장기 기관 중 하나인 비장(spleen)의 세포 증식에 유자 30% 주정추출물이 미치는 영향을 측정하였고 외부의 자극이 존재할 때 변화하는 전사인자인 NF- κ B의 활성을 확인하였으며, 이로 인해 발현에 영향을 받을 수 있는 염증성 사이토카인과 염증 반응의 주요 요소인 cyclooxygenase(COX)-2와 prostaglandin E (PGE)2의 발현을 확인하였다. 또한 병원균에 감염된 세포를 직접적으로 공격하여 인체의 방어 작용을 담당하는 NK 세포 활성화에 미치는 유자 주정추출물의 영향과 면역 증강의 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

유자 30% 주정추출물(*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka ethanol extract; CJE) 제조에 사용된 유자는 경일약업사(Yeongcheon, Korea)에서 구입하였고, 30%의 에탄올을 포함하는 정제수 혼합용액으로 추출한 후 추출액을 Whatman No.4 filter paper(Whatman plc, Kent, UK)로 여과하였다. 이를 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결건조 하여 분말 형태의 추출물을 다시 멸균한 3차 증류수에 녹여서 실험에 사용하였다.

세포 배양

RAW264.7 세포는 마우스 유래의 대식세포이고, YAC-1 세포는 마우스 림프종 유래 세포로 두 세포주 모두 경희대학교 의학영양학과(Suwon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 배지의 조성을 RAW264.7 세포는 DMEM(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)에, YAC-1 세포는 RPMI-1640(HyClone Laboratories)에 각각 10% fetal bovine serum(FBS, HyClone Laboratories)과 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin(HyClone Laboratories)을 첨가하였고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 생존율

CJE의 RAW264.7 세포에 대한 최적 처리 농도를 결정하

기 위하여 WST(Water Soluble Tetrazolium Salt) 시약인 EZ-CYTOX Cell Viability assay kit(DAEIL LAB SERVICE Co., Ltd., Seoul, Korea)을 이용하여 살아 있는 세포의 양을 측정하였다. RAW264.7 세포는 1 \times 10⁴ cells/well이 되도록 96 well cell culture plate(SPL Life Science, Pochon, Korea)에 분주하여 안정화시킨 후 유자 추출물을 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1,000 μ g/mL의 농도가 되도록 DMEM 배지에 희석하여 48시간 동안 배양하였다. WST 시약을 20 μ L씩 각 well에 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 반응시킨 후 microplate reader(Spectra-MAX340PC384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 450 nm로 흡광도를 측정하였다.

CJE의 NF- κ B, COX-2, PGE2 발현능 평가

염증반응의 주요 요소인 NF- κ B, COX-2, PGE2의 발현능을 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 진행하였다. RAW264.7 세포를 60 mm culture dish에 5 \times 10⁶ cells/well의 농도로 분주하여 안정화시킨 다음 여기에 CJE는 농도별로, LPS는 1 μ g/mL를 24시간 동안 처리하였다. NF- κ B의 활성을 확인하기 위해서는 세포 핵 내로 전좌된 NF- κ B의 측정이 필요하므로 핵 단백 추출물을 얻은 다음 이 용균액을 이용하여 실험을 진행하였고, 측정은 Trans-AM NF- κ B Chemiluminescence kit(Active Motif, Carlsbad, CA, USA)을 이용하였다. COX-2의 발현은 real-time PCR 기법을 통해 검증하였는데, RAW264.7 세포의 NF- κ B 활성을 확인하기 위한 상기 실험과 같은 조건으로 처리한 뒤 RNeasy extraction kit(Qiagen)으로 제조사의 실험방법에 따라 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA로 PrimeScriptTM Reverse Transcriptase(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였고, 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용한 real-time PCR을 PIKOREAL 96(Thermo Scientific, Tewksbury, MA, USA) 기기를 이용하여 실시하였다. 분석에 사용한 각각의 primer의 염기서열은 GAPDH forward 5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA-3', reverse 5'-GCG GCA CGT CAG ATC CA-3', COX-2 forward 5'-CCA GCA CTT CAC CCA TCA GTT-3', reverse 5'-ACC CAG GTC CTC GCT TAT GA-3'이었다. 또한 PGE2는 상등액을 이용하여 측정하는 실험으로, prostaglandin E2 parameter assay kit(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)을 구입하여 제조사의 실험 방법에 따라 측정하였다.

CJE의 산화질소 유도능 평가

RAW264.7 세포를 1 \times 10⁴ cells/well이 되도록 96 well cell culture plate(SPL Life Science)에 분주하여 안정시킨 후 DMEM 배지에 희석한 CJE를 농도별(25, 50, 100,

300, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하였고, 양성대조군으로 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 lipopolysaccharide(LPS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 처리하여 24시간 배양하였다. 새로운 96 well plate에 세포배양 상등액 50 μL 와 동량의 그리스 시약(Griess reagent, Sigma-Aldrich Co.)을 넣어 상온에서 15분간 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices)에서 흡광도 540 nm로 측정하였다. 산화질소의 농도는 질산화나트륨(sodium nitrite, NaNO_2 , Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 얻은 표준곡선으로 계산하였다.

Real-time PCR에 의한 CJE의 사이토카인 발현능 평가

RAW264.7 세포를 60 mm cell culture dish에 5×10^6 cells/well의 농도로 분주하여 안정화시킨 후 CJE 25, 50, 100, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 양성대조군으로 설정한 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 4시간 동안 처리한 다음 RNeasy extraction kit(Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)으로 제조사의 실험방법에 따라 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA로 Prime-ScriptTM Reverse Transcriptase(Takara Bio Inc.)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)(Roche Diagnostics)를 이용하여 real-time PCR을 PIKOREAL 96(Thermo Scientific) 기기를 이용하여 실시하였다. 분석에 사용한 각각의 primer의 염기서열은 GAPDH forward 5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA-3', reverse 5'-GCG GCA CGT CAG ATC CA-3', TNF- α forward 5'-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A-3', reverse 5'-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC-3', IL-1 β forward 5'-GGA GAA CCA AGC AAC GAC AAA ATA-3', reverse 5'-TGG GGA ACT CTG CAG ACT CAA AC-3', IL-10 forward 5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3', reverse 5'-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3', IL-6 forward 5'-GTT TTC TGC AAG TGC ATC ATC G-3', reverse 5'-GGT TTC TGC AAG TGC ATC ATC G-3'와 같다.

마우스 비장세포 분리 및 NK 세포 활성 측정

6~7주령 male ICR 마우스는 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하였고, 서울아산병원 아산생명과학연구원 실험동물실험실(IACUC 승인번호: 2014-12-177)의 연구 지침에 따라 이산화탄소를 이용한 안락사 방법을 통해 희생시켜 비장을 적출하였다. 비장은 40 μm size cell strainer(SPL Life Science)에서 마쇄하여 RPMI-1640(HyClone Laboratories)에 10% fetal bovine serum(FBS, HyClone Laboratories)과 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin(HyClone Laboratories)을 첨가한 배지로 세척한 후, red blood cell lysing buffer(Sigma-Aldrich Co.)로 적혈구를 제거하였다. YAC-1 세포(NK-sensitive cell line)는 NK 세포에 의해 공격되는 세포로 YAC-1 세포

가 NK 세포에 의해 공격을 받아 배지에 유리된 lactate dehydrogenase(LDH)를 측정하여 NK 세포의 활성을 측정하였다. NK 세포와 YAC-1 세포를 96 well plate에 여러 농도별 CJE와 함께 분주하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 4시간 동안 배양한 후 유리된 LDH를 LDH-Cytotoxicity Colorimetric assay kit II(Biovision, Milpitas, CA, USA)로 kit의 protocol을 따라 측정하였다.

비장세포 증식능 측정

비장세포의 증식능에 미치는 유자 추출물의 영향을 측정하기 위하여 마우스에서 분리한 비장세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 CJE를 농도별로 처리하였다. 양성대조군으로 Concanavalin A(Sigma-Aldrich Co.) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하여 48시간 배양하고 여기에 EZ-CYTOX Cell Viability assay kit(DAEIL LAB SERVICE Co., Ltd.)을 처리하고 37°C, 5% CO_2 조건에서 3시간 동안 반응시켜 microplate reader(Molecular Devices)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3번 이상 반복하여 평균값과 오차를 구하여 나타내었고, 통계처리는 SPSS(Statistical Package for Social Science, version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 실험군 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결 과

세포독성

세포 실험에 사용할 유자 추출물의 최적 농도를 결정하기 위해 실시한 세포독성 시험에서 유자 30% 주정추출물(CJE)은 최저 농도 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 최고 농도 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 RAW264.7 세포에 처리한 결과 최고 농도에서도 48시간까지 독성을 나타내지 않았다. 세포독성 시험 결과는 Fig. 1에 제시하였으며, 독성실험 결과에서 확인된 안전농도 범위 안에서 이후의 실험을 진행하였다.

CJE의 NF- κ B, COX-2, PGE2 발현능 평가

외부 자극인자인 LPS를 대식세포에 처리하면 세포막에 존재하는 수용체(Toll-like receptor, TLR4)와 결합하게 되고, 이에 의해 세포질에 있는 전사인자인 NF- κ B가 활성을 띠게 된다. 이를 통해 염증성 사이토카인의 발현이 증가하고, 염증성 인자인 COX-2 또한 활성을 가지게 되어 arachidonic acid로부터 PGE2를 발생시킨다(9). NF- κ B의 활성화로 인하여 사이토카인들과 COX-2, PGE2가 과하게 발현하면 인체에 악영향을 미칠 수 있지만 적정수준 내에서 발현의 촉진이 이루어질 경우 면역 반응을 촉진하게 된다

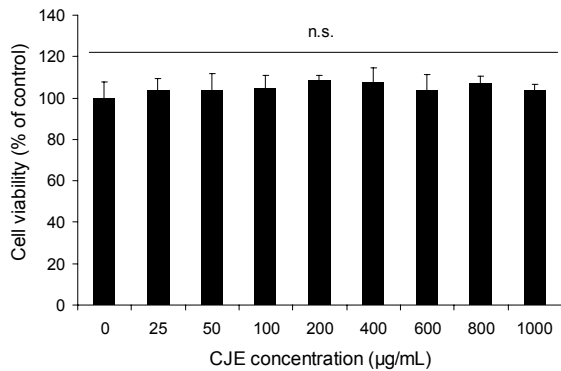


Fig. 1. Effect of *Citrus junos* ethanolic extracts (CJE) on the cell viability of RAW264.7 macrophage. The results are mean±SD of triplicate experiment. n.s.: no significance.

(10). 따라서 선천성 면역 반응의 촉진, 증강의 가능성 및 그 기전을 확인하기 위해 NF-κB의 활성화도, COX-2의 발현, PGE2의 생성량을 측정하였고 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2A는 NF-κB 활성도를 그래프로 나타낸 것으로, 정상대조군 대비 LPS만을 처리한 양성대조군에서 활성화도가 4배 이상 증가하였다. CJE 처리한 실험군에서도 농도 의존적인 경향을 보이며 활성화도가 증가하는 것을 알 수 있었는데, 특히 300~500 µg/mL의 농도에서 유의미한 차이를 보였다. Fig. 2B는 mRNA 수준에서 COX-2 유전자 발현의 결과를 나타낸 그래프로, 정상대조군에 비해 양성대조군에서의 발현이 약 3.3배 높았다. CJE만을 농도별로 처리하였을 때 NF-κB 활성화 결과와 마찬가지로 300~500 µg/mL의 농도에서 유의미한 차이를 보이며 COX-2의 발현이 증가하

는 경향을 보였다. Fig. 2C는 PGE2의 분비를 측정된 결과로, 앞선 두 결과와 마찬가지로 정상대조군 대비 양성대조군에서 유의적으로(약 6배 이상) 증가하였고 300~500 µg/mL의 농도에서 유의미한 차이를 보이며 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. CJE의 NF-κB 활성화, COX-2의 발현, PGE2의 분비 증가는 양성대조군인 LPS 처리군에 비해 모두 유의적으로 낮은 수치를 기록했다($P < 0.05$). 이러한 결과들을 통해 CJE가 NF-κB의 활성을 높이고 이를 통해 COX-2의 발현이 증가되도록 하여 PGE2의 분비에도 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

CJE의 산화질소 유도능 평가

대식세포에 LPS를 처리하면 염증 반응을 일으켜 TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 등의 사이토카인과 산화질소와 같은 염증 관련 인자의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(11). 특히 산화질소는 자유 라디칼로서 심혈관계, 신경계 및 면역계의 전달 물질로 세포 내 항상성 유지, 신경전달 물질의 운반, 항암작용 등의 기능을 한다(12). 이것이 과량 생성되면 전신적 염증을 유발하여 생체에 여러 부정적인 영향을 미칠 수 있으나 적정량의 산화질소 생성은 선천성 면역의 중요한 인자로 여겨진다(13). 따라서 본 연구에서는 정상대조군, LPS만을 처리한 양성대조군과 LPS를 처리하지 않고 CJE를 농도별로 처리한 실험군이 생성해내는 산화질소에 대해 측정하였다. CJE를 처리하였을 때 유도되는 산화질소와 LPS를 처리하였을 때 유도되는 산화질소의 분비량을 비교하여 CJE가 선천성 면역을 활성화시킬 정도의 산화질소를 생성하는지 확인하였고, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

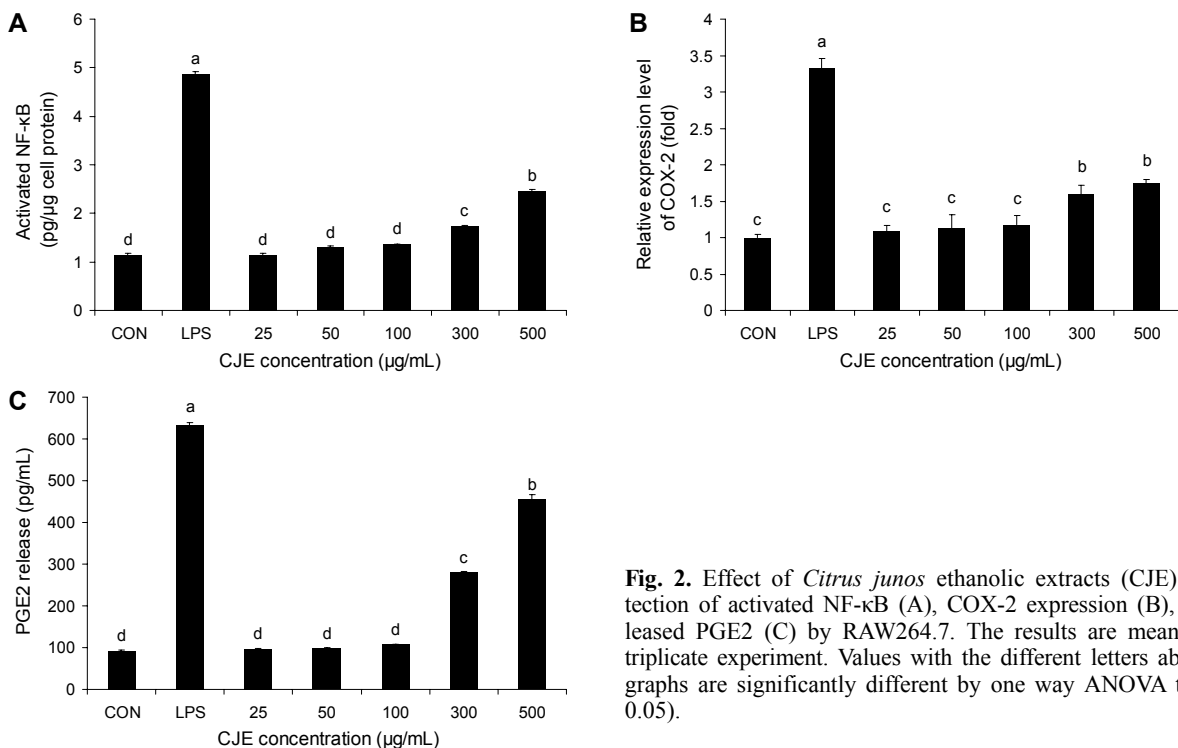


Fig. 2. Effect of *Citrus junos* ethanolic extracts (CJE) on detection of activated NF-κB (A), COX-2 expression (B), and released PGE2 (C) by RAW264.7. The results are mean±SD of triplicate experiment. Values with the different letters above bar graphs are significantly different by one way ANOVA test ($P < 0.05$).

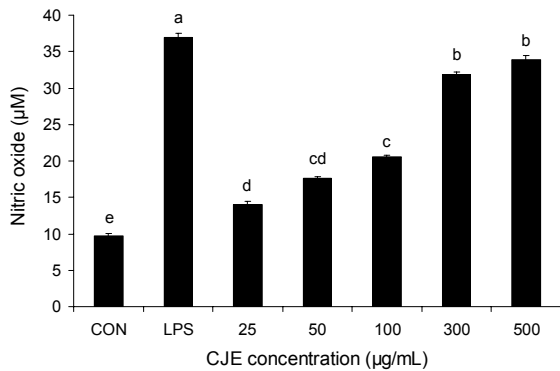


Fig. 3. Effect of *Citrus junos* ethanolic extracts (CJE) on nitric oxide production by RAW264.7. Values with the different letters above bar graphs are significantly different by one way ANOVA test ($P < 0.05$).

양성대조군은 대조군에 비해 약 4배가량 많은 양의 산화질소를 생성하였고 CJE는 25 µg/mL의 농도에서부터 300 µg/mL까지 산화질소의 분비가 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으나, CJE 300 µg/mL와 500 µg/mL 사이에서는 산화질소의 증가에 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. CJE의 산화질소 분비능은 양성대조군인 LPS 처리군보다는 모두 유의적으로 낮았다($P < 0.05$).

사이토카인 발현능

선천성 면역 반응의 중요 인자로 여겨지는 TNF- α 나 IL-1 β , IL-6, IL-10 등과 같은 사이토카인은 대식세포가 활성화되면 발현이 증가하게 되고 이를 통해 다른 면역세포들의 면역 반응을 촉진시키는 역할을 하게 되는데, CJE가 이들 사이토카인 발현에 미치는 효과를 측정하기 위하여 다음의 실험을 계획하였다. 산화질소 생성능의 평가 시험 방법과 마찬가지로 어떤 처리도 하지 않은 정상대조군, LPS만을 처리한 양성대조군, CJE를 농도별로 처리한 실험군이 발현해내는 사이토카인을 real-time PCR을 통하여 측정하였다. Fig. 4A는 TNF- α 의 발현을 측정한 결과로, 정상대조군에 비해 LPS를 처리한 양성대조군에서 2배 많은 양의 TNF- α 를 발현하였다. 세포에 처리된 CJE 추출물의 농도가 증가할수록 TNF- α 의 발현이 증가하는 경향을 보였으나, 500 µg/mL의 농도에서 보인 결과가 정상대조군에 비해 유의적인 차이를 보였고 그 이하의 농도에서는 정상대조군과 유의미한 차이를 보이지는 못했다. Fig. 4B는 단핵구나 대식세포 등에서 분비되어 T 세포를 활성화시키는 것으로 알려진 IL-1 β 의 발현을 측정한 결과로, LPS에 의해 양성대조군의 IL-1 β 발현량이 정상대조군에 비해 약 2배가량 증가한 것을 알 수 있었다. CJE만 처리한 실험군에서 CJE 농도 의존적으로 IL-1 β 의 발현이 증가하는 경향을 가진다는 결과를 얻었고, 특히 500 µg/mL의 농도에서는 LPS군과 비슷한 수준까지 증가하는 것을 확인하였다. Fig. 4C는 B 세포 분화

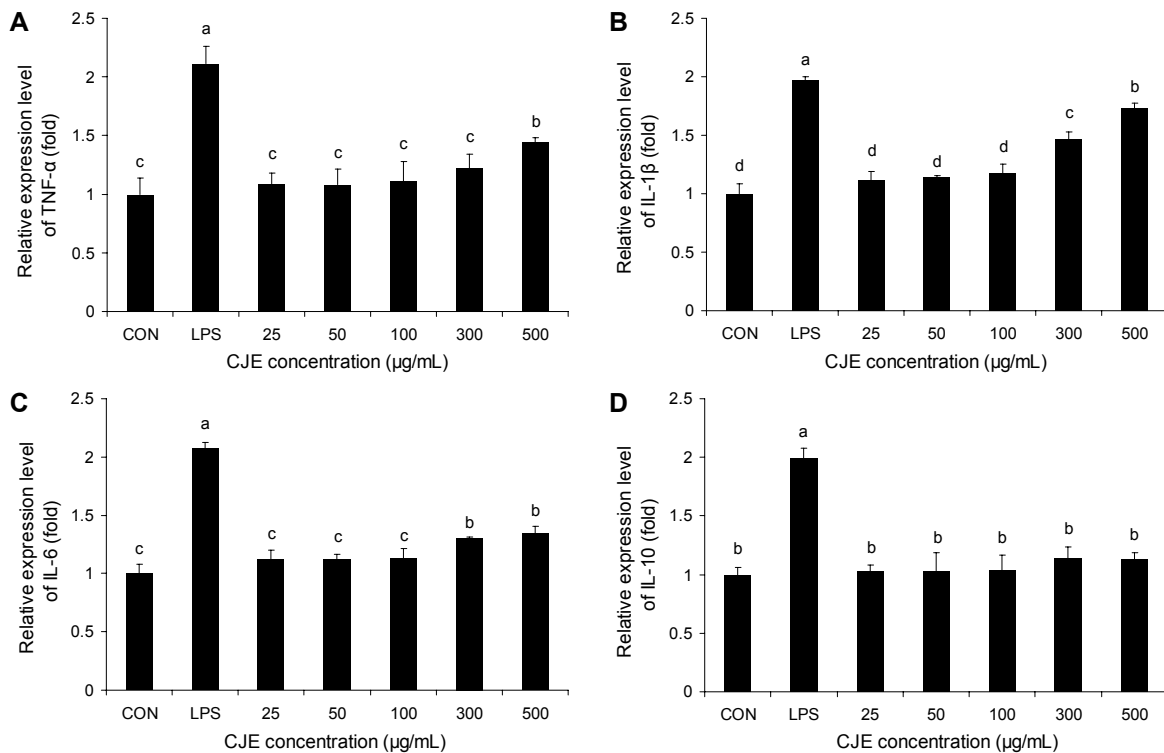


Fig. 4. Effect of *Citrus junos* ethanolic extracts (CJE) on cytokines expression levels by RAW264.7 macrophage. The results are mean \pm SD of triplicate experiment. A, tumor necrosis factor (TNF)- α ; B, IL-1 β ; C, IL-6; D, IL-10. Values with the different letters above bar graphs are significantly different by one way ANOVA test ($P < 0.05$).

활성을 가진 사이토카인 IL-6의 발현을 확인한 그래프로, CJE 300 µg/mL 이하의 농도에서는 유의미한 변화를 보이지 못하였지만 300~500 µg/mL의 농도에서 정상대조군과 유의적인 발현량의 차이를 보이는 것을 확인하였다. 그러나 양성대조군의 발현량에 대하여 약 64% 정도의 발현량을 보였으며, 이는 정상대조군과 현격한 차이를 보이지는 못하였다. Fig. 4D는 Th2 세포에서 생성되는 사이토카인 IL-10의 발현을 나타낸 그래프인데, IL-10은 Th1 세포에서 생성하는 TNF-α나 IL-1β, IL-6의 생산을 억제적으로 조절하여 여러 가지 염증성 사이토카인 생성의 균형을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. IL-10의 발현은 정상대조군 대비 양성대조군에서만 약 2배가량 유의적으로 발현이 증가함이 나타났으며, 정상대조군과 양성대조군에 비해 CJE 처리군에서는 통계적으로 유의미한 차이는 보이지 않았다.

NK 세포 활성 측정

NK 세포는 선천성 면역 반응 중 하나로 바이러스에 감염된 세포, 종양 세포, 비정상 세포, 표적 세포를 인지하여 결합한 뒤 독성과립들을 세포에 통과시켜 세포사멸을 유도한다(14). NK 세포의 활성화는 다양한 활성화 및 억제 수용체를 통한 신호전달 균형에 의해 조절되는데, 이렇게 세포와 결합했을 때 오는 활성화 신호와 억제 신호를 인식하여 정상 세포는 공격하지 않고 비정상 세포는 제거함으로써 세포 살해 활성이 조절된다(15,16). NK 세포의 활성 측정은 YAC-1 세포에 대한 NK 세포의 공격으로 인해 발생하는 LDH를 측정함으로써 평가하는데, CJE 처리에 따른 NK 세포 활성을 Fig. 5에 제시하였다. CJE 추출물은 NK 세포의 활성에 농도 의존적으로 영향을 주는 것으로 나타났으며, 특히 300 µg/mL의 농도에서부터 정상대조군 대비 유의적인 차이를 보이는 것으로 나타났다.

비장세포 증식능

비장은 혈액에서 유래되는 항원에 대해 반응하는 주요 면역 반응 기관으로, 특히 T 및 B 림프구의 성숙과 항원 자극

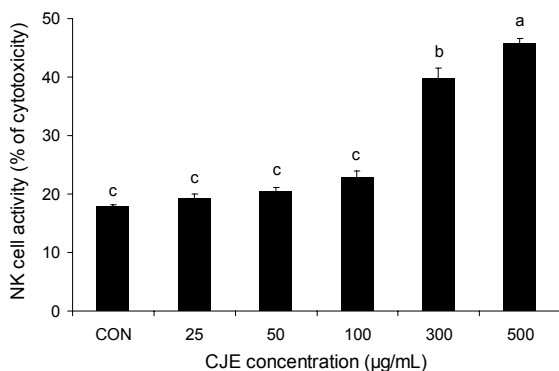


Fig. 5. Effect of *Citrus junos* ethanolic extracts (CJE) on NK cell activity by splenocytes. The results are mean±SD of triplicate experiment. Values with the different letters above bar graphs are significantly different by one way ANOVA test ($P<0.05$).

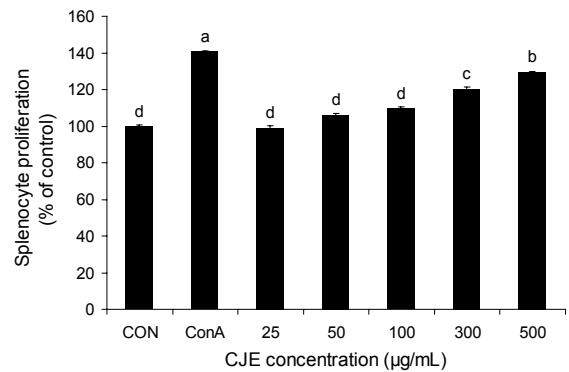


Fig. 6. Effect of *Citrus junos* ethanolic extracts (CJE) on proliferation rate of mouse primary splenocytes. The results are mean±SD of triplicate experiment. Values with the different letters above bar graphs are significantly different by one way ANOVA test ($P<0.05$).

에 의한 림프구의 분화가 이루어지기 때문에 비장 내 림프구의 증식은 면역 시스템에서 중요한 의미를 가진다(17). Concanavalin A(Con A)는 *in vitro* 상에서 마우스 T 세포의 자극을 위해 처리하는 물질로 T 세포의 활성화, 증식, CD4와 CD8 세포로의 분화를 유도하게 된다(11). 이러한 특징으로 인해 Con A를 양성대조군으로 사용하게 되었고 그와 비교하여 CJE 추출물이 마우스의 비장세포 증식에 어떤 영향을 주는지 측정하였다. Fig. 6의 결과에서 알 수 있듯이 CJE는 농도 의존적으로 마우스 비장세포의 증식을 촉진시키며, 특히 300 µg/mL의 농도에서부터 정상대조군 대비 유의적인 차이를 나타내는 것을 확인하였다.

고 찰

유자는 우리나라 남해안 지방에서 나는 감귤류의 일종으로 뛰어난 향과 특유의 산미를 가지고 있고 주로 과육 및 과피를 사용해 유자청으로 제조되어 유자차로 이용되어 왔으며, 유자에 함유되어 있는 hesperitin, naringin, naringenin 등 다량의 플라보노이드 화합물에 의한 항산화 효능이 연구되었다(18). 또한 유자의 오일 내에 존재하는 limonene 성분은 면역세포인 호중구에서 항염증 효과가 있음이 보고되었으나(19), 유자의 선천성 면역기능에 대한 연구는 미비하여 유자 30% 주정추출물을 이용한 면역조절 효능을 평가하고자 하였다.

유자 30% 주정추출물(CJE)의 면역력 효능 평가의 안전 범위 확인을 위해 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7을 이용하여 최저 농도 25 µg/mL에서부터 최고 농도인 1,000 µg/mL로 48시간 동안 처리하였다. 최고 농도인 1,000 µg/mL로 48시간 처리한 결과 세포 생존율이 대조군과 거의 비슷하거나 오히려 세포생존에 도움을 주는 것으로 나타났으므로 추가적인 안전성 검증을 통하여 CJE의 식품으로의 개발이 가능할 것으로 사료된다. 대식세포는 탐식작용을 하는 면역세포로 인체의 거의 모든 조직에 존재하는 내재면역

의 중요한 1차 방어기능을 담당하는데(4), 세균이나 이물질을 탐색, 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하고 면역작용에 필요한 물질들을 분비하는 등 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 한다(20). 면역세포에 LPS와 같은 면역 유발 물질을 처리하면 세포질의 전사인자인 NF- κ B는 활성화되어 핵 안으로 전좌되고 이후 COX-2나 염증성 사이토카인의 발현 증가 및 축진을 통해 면역 반응은 더욱 활성화된다(9). CJE가 면역반응에 미치는 영향을 측정하고 선천성 면역 증진의 가능성을 확인하기 위한 실험을 진행하였는데, NF- κ B의 활성화도, COX-2의 발현, PGE2의 분비는 CJE에 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히 300 μ g/mL의 농도에서부터 정상대조군과 유의적인 차이를 보이는 결과가 나타났다. PGE2의 분비뿐만 아니라 대식세포에서 생성되는 염증성 물질인 산화질소는 면역계에서 종양세포나 세포내 감염된 미생물에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호전달물질로, 과량 생성되면 전신적 염증을 유발하여 생체에 여러 부정적인 영향을 미칠 수 있으나 적정량의 산화질소 생성은 선천성 면역의 중요한 인자로 여겨진다(13). 감초, 견지황, 당귀, 도라지, 목천료 생약추출물에 의한 RAW264.7의 산화질소 생성능을 평가한 연구에서 이들 생약추출물들은 양성대조군인 LPS의 처리와 비슷한 수준으로 대식세포의 산화질소 생성능을 보였다(5). 본 연구에서 CJE의 대식세포의 산화질소 생성능은 양성대조군인 LPS에 의한 산화질소 생성능보다 높지는 않았지만 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였고 300 μ g/mL의 농도에서부터 유의적인 차이를 보였으며, 500 μ g/mL 이후의 농도에서는 그 증가가 크지 않아 산화질소 생성의 유효 농도는 300~500 μ g/mL로 사료된다(데이터 제시 안함). 본 연구에서 측정된 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6는 대식세포에 분비되는 사이토카인인데, 이들을 측정함으로써 대식세포의 면역 활성을 예측할 수 있다. 활성화된 대식세포는 미생물 및 바이러스에 감염된 세포를 제거하는 능력이 크게 증가한다(6). CJE 처리에 의해 RAW264.7에서 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6의 유전자 발현은 LPS 처리군보다는 낮았으나 CJE에 농도 의존적으로 증가하였고, 특히 300 μ g/mL의 농도에서부터 유전자 발현이 증가하는 결과를 보였다. 그러나 IL-10 유전자 발현은 유의미한 변화를 보이지는 못했다. 대식세포에서 분비하는 산화질소는 염증유도 사이토카인을 억제하는 항염증 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)인 IL-10을 증가시킨다. Fig. 3에서 CJE는 RAW264.7 세포의 산화질소 분비를 증가시켰으나 그 증가량이 IL-10의 유전자 발현에 영향을 줄 만큼 의미 있는 수치는 아니었던 것으로 사료된다. 본 연구에서는 대식세포의 탐식작용(phagocytosis assay)을 직접적으로 측정하지는 않았지만, 대식세포가 활성화되었을 때 증가하는 지표인 NF- κ B, COX-2, PGE2, 산화질소, TNF- α , IL-1 β 등의 유전자 발현 증가를 확인하였다. 이를 통해 CJE는 대식세포가 활성화되어 탐식작용과 같은 면역기능에도 도움을 줄 수 있을 것이라는

결론을 내리게 되었다. 또한 CJE는 NK 세포의 활성을 높이고 도파주하고 비장세포의 증식을 촉진시키는 것으로 Fig. 5와 Fig. 6의 결과에 나타났다. 비장은 혈액으로부터 항원을 수집하여 T 세포와 B 세포의 성숙이 일어나고 항원에 의해 자극받은 후 림프구의 분화가 일어나는 면역력을 관장하는 주요기관(12)인데, 비장세포 증식 활성은 CJE에 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보이는 것이 확인되었다. 500 μ g/mL의 농도에서는 대조군에 비해 130%의 증식 활성을 보였지만 면역반응 매개체(immune modulator)인 LPS로 자극을 주었을 때보다는 낮은 증가를 보였다. 이러한 결과는 CJE의 투여가 비장세포를 증식시키는 mitogen 활성이 있음을 보여주는 것으로, 외부의 항원에 노출되었을 때 CJE가 항원에 대한 면역반응을 유도하는 면역세포의 수를 증가시킴으로써 항원에 대한 효과적인 방어에 도움을 줄 것이며, 세포 실험 상에서 면역증강에 도움을 줄 수 있는 농도는 300~500 μ g/mL이므로 이를 바탕으로 추후에 실험동물을 이용한 *in vivo* 후속 연구를 통해 CJE를 이용한 면역증강 기능성 식품 개발이 가능할 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구에서는 유자가 선천성 면역력에 미치는 효과를 알아보기 위하여 유자 30% 주정추출물(CJE)을 사용하였으며 선천성 면역에 중요한 역할을 하는 대식세포를 이용해 실험하였다. CJE는 마우스 대식세포인 RAW264.7에서 1,000 μ g/mL의 최고 농도까지 세포독성을 보이지 않았고, 전사인자 NF- κ B와 염증성 매개물질인 COX-2, PGE2의 활성 및 발현 증강에 영향을 미치며, 특히 300 μ g/mL의 농도에서부터 유의적 차이를 보이는 것으로 확인되었다. 산화질소 생성능과 대식세포에서 분비되는 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 의 발현을 대조군에 비해 농도 의존적으로 증가시킨다는 결과를 얻었으나, IL-6에서는 통계적으로 약간의 유의성이 있는 증가를 보였고 IL-10은 양성대조군에 비해 거의 유의적인 차이를 보이지 않았다. CJE는 또한 NK 세포의 활성을 농도 의존적으로 증가시키고 비장세포의 증식농도 농도 의존적으로 증가시킨다는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 CJE는 인체의 대식세포 활성의 증가를 통해 선천성 면역력을 증가시킬 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 산업통산자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성사업의 일환으로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Yu AR, Park HY, Kim YS, Ha SK, Hong HD, Choi HD. 2012. Immuno-enhancing effect of seed extracts on a RAW

- 264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1671-1676.
2. Uthaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good RA, Haraguchi S. 2002. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 88: 253-264.
 3. Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerd S. 2001. Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. *Hautarzt* 52: 193-200.
 4. Yoo SA, Kim OK, Nam DE, Kim Y, Baek H, Jun W, Lee J. 2014. Immunomodulatory effects of fermented *Curcuma longa* L. extracts on RAW 264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 216-223.
 5. Yu AR, Park HY, Choi IW, Park YK, Hong HD, Choi HD. 2012. Immune enhancing effect of medicinal herb extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1521-1527.
 6. Byun MW. 2013. Immunomodulatory activities of apple seed extracts on macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1513-1517.
 7. Miyazawa N, Tomita N, Kurobayashi Y, Nakanishi A, Ohkubo Y, Maeda T, Fujita A. 2009. Novel character impact compounds in yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) peel oil. *J Agric Food Chem* 57: 1990-1996.
 8. Jin TY, Wang MH, Yin Y, Eun JB. 2008. Effect of *Citrus junos* peel on the quality and antioxidant activity of traditional rice wine, *Jinyangju*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 76-82.
 9. Kim DH, Chung JH, Yoon JS, Ha YM, Bae S, Lee EK, Jung KJ, Kim MS, Kim YJ, Kim MK. 2013. Ginsenoside Rd inhibits the expressions of iNOS and COX-2 by suppressing NF- κ B in LPS-stimulated RAW264.7 cells and mouse liver. *J Ginseng Res* 37: 54-63.
 10. Kim AJ, Kim YO, Shim JS, Hwang JK. 2007. Immunostimulating activity of crude polysaccharide extract isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1428-1438.
 11. Kang BK, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Park JH, Bae NY, Ahn DH. 2014. Immuno-stimulating activities of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice concentrates on mouse macrophages and spleen cells. *Kor J Fish Aquat Sci* 47: 776-784.
 12. Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705-707.
 13. Kim JJ, Lee SW, Park KW, Seo KI, Yee ST. 2012. Effect of *Flammulina velutipes* extracts cultivated with oriental herbal plants on the activation of immune cells. *J Life Sci* 22: 828-836.
 14. 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.
 15. Frese-Schaper M, Keil A, Yagita H, Steiner SK, Falk W, Schmid RA, Frese S. 2014. Influence of natural killer cells and perforin-mediated cytotoxicity on the development of chemically induced lung cancer in A/J mice. *Cancer Immunol Immunother* 63: 571-580.
 16. Ha Y, Kim OK, Nam DE, Kim Y, Kim E, Jun W, Lee J. 2015. Effect of *Curcuma longa* L. extracts on natural killer cells and T cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 307-313.
 17. Ryu DS, Kim SH, Lee DS. 2008. Immunomodulating activity of *Salicornia herbacea* extract. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36: 135-141.
 18. Yoo KM, Hwang IK, Park JH, Moon B. 2009. Major phytochemical composition of 3 native Korean citrus varieties and bioactive activity on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J Food Sci* 74: C462-C468.
 19. Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song HS, Sawamura M, Suganuma N. 2010. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos* Tanaka) essential oil on eosinophils. *J Food Sci* 75: H87-92.
 20. Seo YS, Shin KS. 2012. Immune system-stimulating activities of mucilage polysaccharides isolated from *Opuntia humifusa*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 95-102.