

<원 저>

발효녹용 추출물에 의한 비장세포의 생존율 및 interleukin-12 생산 증진

양혜열¹ · 김영수² · 주홍구^{1,*}

¹제주대학교 수의과대학 수의약리학실, ²맑은샘한의의원

Fermented antler extract enhances the viability and interleukin-12 production of spleen cells

Hye-Yeoul Yang¹, Youngsu Kim², Hong-Gu Joo^{1,*}

¹Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

²Malgeunsaem Korean Medicine Clinic, Jecheon 27159, Korea

(Received: February 2, 2016; Revised: June 9, 2016; Accepted: June 25, 2016)

Abstract: The effects of antlers have long been known in traditional Asian medicine. However, few studies have investigated the effects of antlers on immunity. In this study, we investigated whether fermented antler extract (FAE) has immunomodulatory effects on spleen cells. FAE enhanced the activity of spleen cells in a concentration dependent manner compared to antler extract. Interestingly, FAE significantly increased the production of interleukin-12, a representative cytokine of cell-mediated immunity, while it marginally increased that of tumor necrosis factor-alpha. Flow cytometry analysis demonstrated that FAE can protect spleen cells from spontaneous cell death without a significant proportional change in subsets, mainly lymphocytes. Taken together, the results of the present study showed that FAE has beneficial effects on spleen cells, a major type of immune cell, indicating that it can function as an immunomodulator without significant cytotoxicity. These data may broaden the use of FAE in basic research and clinical areas.

Keywords: fermented antler extract, immunomodulation, spleen cells

서 론

녹용은 2,000년 전부터 한국과 중국에서 한방 치료 약재로 사용되었다. 여러 질병에 대해 다양한 방향으로 사용되었으며, 이를 뒷받침 하기 위해 녹용에 대한 많은 연구가 진행되었다 [16, 17]. 녹용은 항염증효과 [2]와 조혈기능 촉진 [9, 12] 등을 비롯한 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있다.

녹용은 면역증강 효과를 보이는 것으로도 알려졌는데 [18], 현재까지 밝혀진 작용기전은 다음과 같다. 녹용 내의 물질인 phosphatidylcholine의 fatty acyl chains이 림프구의 증식에 영향을 주어 면역반응을 조절할 수 있다 [6]. 또한 마우스 복강의 대식세포를 이용한 실험에서 녹용의 에틸알코올 추출물은 대식세포의 탐식작용을 촉진하였다 [15].

녹용은 세절 과정에서 많은 활성성분이 소실되는데 이런 단점을 보완하기 위해 발효녹용을 개발하여 사용하기 시작했다 [14]. 발효녹용은 최근 연구에서 과골세포 분화를 억제

하는 사실이 보고되었지만 [1], 면역세포에 대한 효과는 매우 미흡한 실정이다.

림프구를 포함한 주요 면역장기인 비장은 특히 혈액유래 항원을 처리하고 체내에서 주요한 면역기능을 수행한다. 본 연구에서는 비장세포를 사용하여 발효녹용의 면역세포에 대한 효과를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

실험동물과 시약

실험에는 8~12주령 사이의 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 실험동물은 오리엔트바이오(대한민국)에서 제공받았으며, 동물실험은 제주대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 시행되었다(승인번호 2016-0001). 발효녹용 추출물(fermented antler extract [FAE])은 맑은샘한의원(대한민국)에서 제공받았다. 녹용추출물(antler extract [AE])은 절단된 건조 녹용에

*Corresponding author

Tel: +82-64-754-3379, Fax: +82-64-756-3354

E-mail: joooh@jejunu.ac.kr

물을 넣어 100°C에서 3시간 동안 열수 추출하고 찌꺼기를 여과한 맑은 액을 동결건조하여 얻었다. FAE는 1차 멸균시킨 녹용을 함유하는 배양액에 *Bacillus licheniformis* KCCM 10885P를 가하여 33°C에서 72시간 동안 발효시킨 후, 여과, 2차 멸균, 동결건조하여 제조하였다(FAE 관련 특허; 대한민국특허 등록번호 10-0808060).

비장세포의 분리와 처리

비장세포를 분리하여 배양하는 실험은 이미 확립된 방법에서 약간의 수정을 거쳐 실시하였다 [5]. 비장의 부착세포를 제거하기 위한 배양시간을 두지 않았고, 세포는 70 µm cell strainer(BD Bioscience, USA)에 걸렸다. 이렇게 얻은 비장세포를 2×10^6 cells/mL의 농도로 96-well 또는 6-well culture plates에 넣고 FAE를 처리한 후 3일간 배양하고 분석하였다.

비장세포의 활성화와 세포생존율 측정

FAE를 마우스의 비장세포에 0~20 µg/mL의 농도로 처리하여 3일간 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT) assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다 [8].

유세포 분석

FAE와 함께 배양된 비장세포를 biotin-labeled anti-cluster of differentiation(CD)4, -CD8a, -CD19 antibody로 처리하였다 [4]. Streptavidin-phycoerythrin을 2차 항체로 처리하고 1% paraformaldehyde 용액으로 고정했다(모든 항체는 BD Biosciences). Rhodamine 123(Sigma, USA)으로 30분간 염색하여 미토콘드리아 막전위를 측정하였으며, propidium iodide(PI; Sigma)로 5~15분간 염색하여 dead cell을 파악하였다. 염색된 세포는 FACSCalibur와 CellQuest (Becton, Dickinson and Company, USA)로 분석하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

비장세포를 2×10^6 cells/mL의 농도로 96-well culture plates에 넣은 후 FAE를 농도별로 처리하였다. 3일간 배양한 후 세포 배양 상층액을 얻었으며, ELISA kit(Invitrogen, USA)을 이용하여 interleukin(IL)-12, tumor necrosis factor (TNF)-alpha의 생산량을 측정하였다 [7].

통계분석

Figure 1과 3은 평균 ± 표준편차로 나타냈다. ANOVA 분석 후에 Turkey 검정으로 유의성을 확인하였다. 0.05 미만의 *p* value를 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

비장세포의 활성화 및 생존율에 대한 FAE의 효과

MTT assay를 통해 비장세포의 생존율을 측정한 결과(Fig.

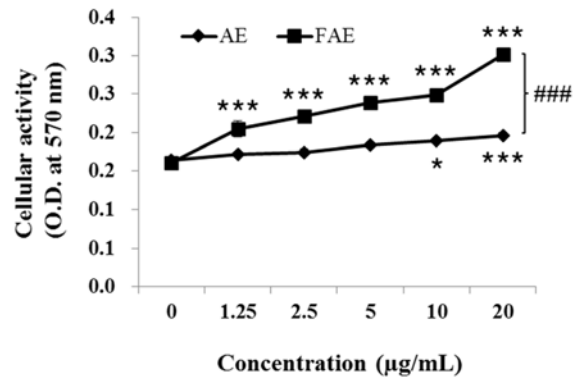


Fig. 1. Fermented antler extract (FAE) increases the cellular activity of spleen cells in a concentration-dependent manner. Spleen cells were treated with antler extract (AE) or FAE for 3 days, and then MTT assay was performed. Data are mean ± SD from four individual wells. * and *** indicate the significant differences at $p < 0.05$ and 0.001 , respectively compared to each control (0 µg/mL), and ### indicates the significant difference at $p < 0.001$ between AE and FAE in the same concentration.

1), FAE는 1.25 µg/mL을 제외한 나머지 농도에서 대조군보다 비장세포의 활성을 1.25~20 µg/mL 농도에서 유의하게 증가시킨 반면($p < 0.001$), AE는 고농도(10~20 µg/mL)에서만 증가시켰다. 또한 FAE는 1.25~20 µg/mL 농도에서 AE에 비해 높은 세포활성을 보였다($p < 0.001$). 이는 FAE가 주요 면역세포의 일종인 비장세포를 자극할 수 있음을 의미한다. 다만, FAE는 기존에 잘 알려진 자극제인 lipopolysaccharide(B cell), concanavalin A(T cell)처럼 강력한 mitogenic 효과는 아니고 중등도 이하의 효과인 것으로 보인다.

비장세포 subset의 구성에 대한 FAE의 효과

FAE가 비장세포의 subset 구성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 비장세포에 FAE를 농도별로 처리한 후 CD4, CD8, CD19의 발현 정도를 측정하였다(Fig. 2). 비장세포에 FAE를 처리하여 3일간 CO₂ 5%, 37°C의 조건으로 세포배양기에서 배양한 후 특이항체로 염색하였고, FACSCalibur을 이용해 분석하였다. 유세포 분석에서 세 가지 표면마커의 발현을 측정하였으나 특징적인 변화는 없었다. 이는 FAE가 비장세포의 주요 subset인 CD4, CD8 T림프구, CD19 B림프구의 구성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

비장세포의 면역 cytokine 생산량에 대한 FAE의 효과

비장세포에 FAE를 처리한 후 3일간 배양하여 IL-12와 TNF-alpha의 생산량을 측정하였다(Fig. 3). IL-12는 세포성 면역을 조절하는 cytokine이고, TNF-alpha는 염증성 cytokine이다. FAE를 비장세포에 처리한 후 IL-12와 TNF-alpha 모두 생산이 증가했다. 하지만 TNF-alpha는 IL-12에 비해서 상대적으로 증가한 생산량은 적었다.

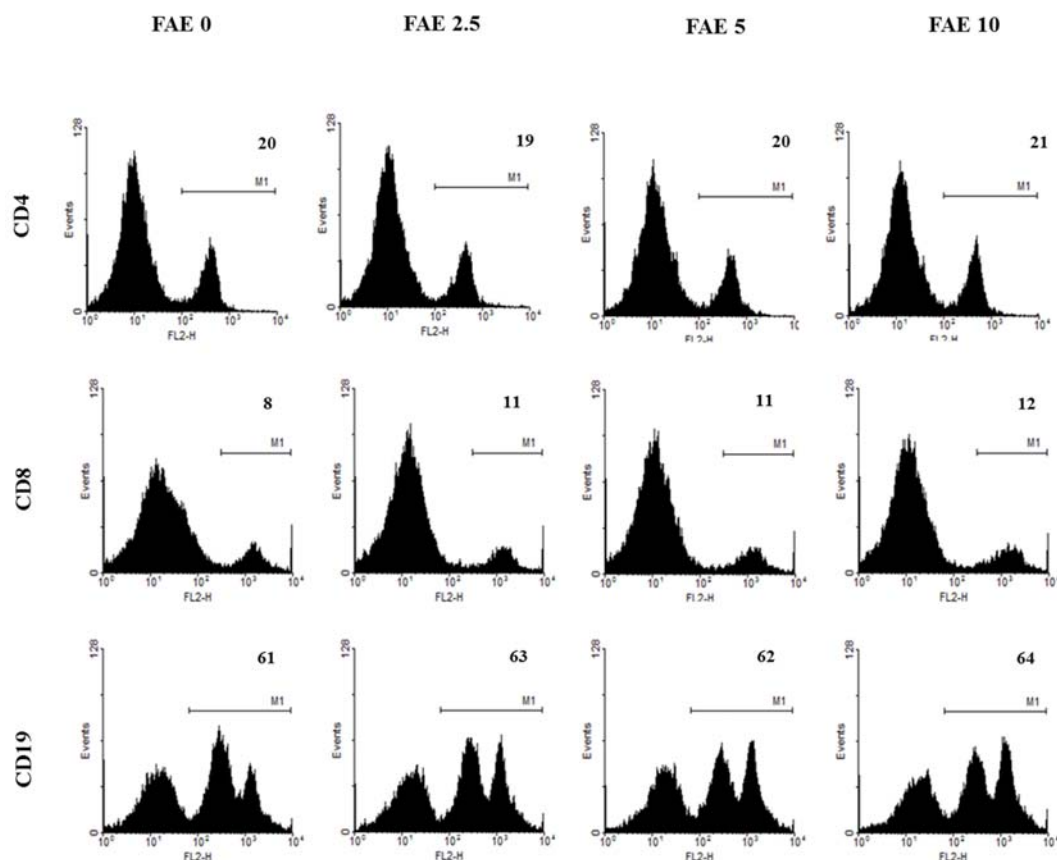


Fig. 2. FAE does not affect the population of major subsets in spleen cells. FAE was treated on spleen cells in 6-well culture plates for 3 days. The treated cells were stained for CD4, CD8, and CD19 molecules by using their specific antibodies. The fluorescence intensity of all stained cells was measured by a flow cytometer. The number on the histogram indicates the percentage of positive cells. Data were obtained from two independent experiments.

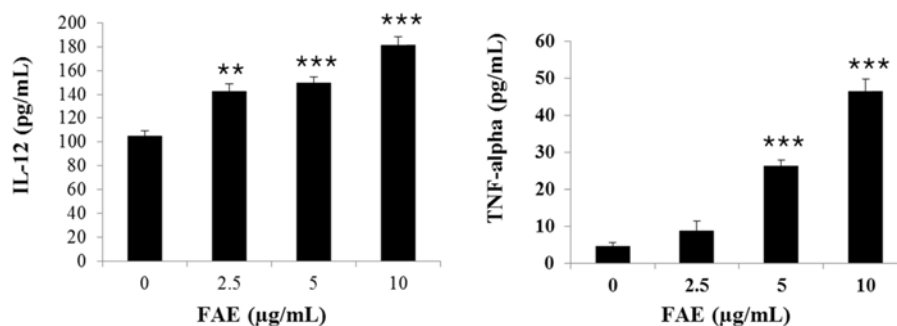


Fig. 3. FAE enhances the production of interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor (TNF)-alpha in spleen cells. The cells were treated with FAE for 3 days. The culture supernatants were harvested and used for ELISA. Two sets of pair antibodies were used for determining the amounts of IL-12 and TNF-alpha in culture supernatants. Data are mean \pm SD from four individual wells. ** and *** indicate the significant differences at $p < 0.01$ and 0.001 , respectively compared to control (FAE 0 $\mu\text{g/mL}$).

비장세포에 FAE를 처리한 후 미토콘드리아 막전위 및 세포사 측정

비장세포에 FAE를 처리하여 3일간 CO_2 5%, 37°C 의 세포 배양기에서 배양하고 Rhodamine 123, PI용액으로 각각 염색한 후 FACSCalibur을 이용해 세포활성 또는 세포사의 정도를 측정하였다(Fig. 4). Rhodamine 123염색은 미토콘드리아

의 활성 막전위를 측정하여 수치가 높을수록 세포활성이 높음을 의미하는데, 막전위 측정에서는 특이적인 결과가 나오지 않았다. 세포사(cell death)를 측정하기 위해 PI 염색을 시행하였다. 수치가 높을수록 죽은 세포 수가 많음을 의미한다. FAE처리에 의해 비장세포의 세포사는 대조군보다 감소하였다.

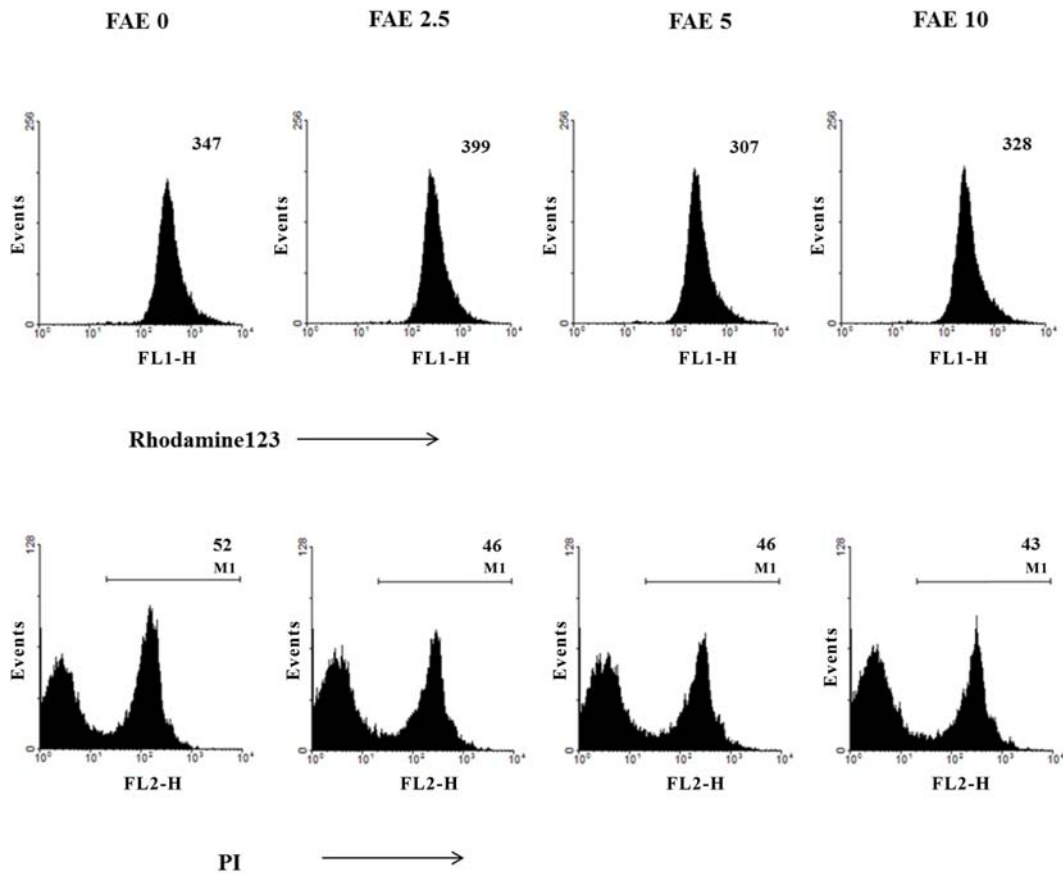


Fig. 4. FAE enhances the survival of spleen cells. FAE was treated on spleen cells in 6-well culture plates for 3 days. The treated spleen cells were stained with Rhodamine 123 (for mitochondrial membrane potential) or with PI solution (for cell death). The number of histograms indicates geometric mean fluorescence intensities. Data were obtained from two independent experiments.

고찰

발효농용의 효능에 대해 몇 가지 연구가 진행되었지만, 면역학적인 효능에 대해서는 알려진 바 없다. 본 연구에서는 림프구를 포함하고 있는 주요 면역세포인 비장세포를 이용하여 발효농용의 면역적인 효능을 분석하였다. FAE를 비장세포에 농도별로 처리하여 세포활성도, 세포 표면마커의 발현, 면역 관련 cytokine의 생산, 세포사멸 정도 등을 조사하였다.

FAE는 농도 의존적(2.5~20 µg/mL)으로 세포활성도를 증가시켰다. 이는 FAE가 비장세포의 생존에 긍정적인 영향을 미친다고 할 수 있다. 림프구의 표면마커인 CD4, CD8, CD19의 발현을 측정한 결과, FAE 처리에 따른 특이적인 변화는 나타나지 않았다. 앞의 세 가지 분자는 T세포(CD4, CD8)와 B세포(CD19)의 대표적인 표면마커이므로, FAE 처리로 비장세포의 림프구 구성비율은 변화하지 않는 것으로 판단된다.

FAE 처리에 따라 비장세포의 기능이 변화하는지 알아보기 위해 ELISA를 실시하였다. FAE는 농도 의존적으로 비장세포에서 IL-12와 TNF-alpha의 생산량을 증가시켰다. IL-12는

세포성 면역을 나타내는 cytokine으로서 T helper 1(Th1)의 의존성 면역반응을 유도한다 [3]. TNF-alpha는 주요 염증성 cytokine으로 알려져 있으며 [10], FAE의 처리 때문에 비장세포에서 생산이 증가하였다. 하지만 대표적인 염증물질인 lipopolysaccharide에 비해 [11] FAE에 의한 TNF-alpha의 생산량이 적어(0~50 pg/mL), FAE의 염증 유도효과는 상대적으로 미미한 것으로 판단된다.

PI 염색을 이용하여 비장세포의 세포사(cell death)를 분석하였다. FAE(2.5~10 µg/mL) 처리군은 PI+(양성)세포의 비율이 대조군보다 일관되게 낮았다. PI는 죽은 세포에 들어가 핵의 DNA와 결합하므로 PI+세포의 비율이 증가하는 것은 죽은 세포의 비율이 증가하는 것을 말한다 [13]. 비장세포는 분리한 후 생체 외에서 배양하면 시간이 지남에 따라 생체 내에서 공급받던 cytokine과 필수영양 요소가 부족해 cytokine-withdrawl cell death가 나타난다. 따라서 FAE는 cytokine의 공급 부족에 따른 세포사로부터 비장세포를 보호할 수 있는 것으로 보인다.

연구 결과, 발효농용이 면역계의 중심 세포인 비장세포의 활성을 유도하고 세포사를 줄이며 특정 cytokine의 생산을 촉진하는 사실을 확인했다. 이번 연구에서 얻은 발효농용의

면역증진 효과는 향후 발효농축을 연구분야와 임상에서 더 널리 사용할 수 있는 데 유용한 정보가 될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 제천시 글로벌 경쟁력 한방바이오산업육성사업의 지원으로 수행되었습니다.

References

1. Choi SW, Moon SH, Yang HJ, Kwon DY, Son YJ, Yu R, Kim YS, Kim SI, Chae EJ, Park SJ, Kim SH. Antiresorptive activity of bacillus-fermented antler extracts: inhibition of osteoclast differentiation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, **2013**, 748687.
2. Dai TY, Wang CH, Chen KN, Huang IN, Hong WS, Wang SY, Chen YP, Kuo CY, Chen MJ. The antiinfective effects of velvet antler of Formosan sambar deer (*Cervus unicornis swinhoei*) on *Staphylococcus aureus*-infected mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, **2011**, 534069.
3. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993, **260**, 547-549.
4. Jang JY, Moon SY, Joo HG. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol* 2014, **68**, 234-238.
5. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a β -galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001, **69**, 555-564.
6. Kim KH, Lee EJ, Kim K, Han SY, Jhon GJ. Modification of concanavalin A-dependent proliferation by phosphatidylcholines isolated from deer antler, *Cervus elaphus*. *Nutrition* 2004, **20**, 394-401.
7. Kim MH, Byon YY, Ko EJ, Song JY, Yun YS, Shin T, Joo HG. Immunomodulatory activity of ginsan, a polysaccharide of *Panax ginseng*, on dendritic cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009, **13**, 169-173.
8. Kim SY, Joo HG. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci* 2015, **16**, 145-150.
9. Lee SH, Suh HJ, Lee HS, Park Y, Park JW, Jung EY. Hematopoietic effect of *Bacillus subtilis*-fermented antler extract on phenylhydrazine-induced hemolytic anemia in Sprague-Dawley rats. *J Med Food* 2012, **15**, 774-780.
10. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001, **104**, 487-501.
11. Moon SY, Joo HG. Anti-inflammatory effects of 4,4'-diaminodiphenyl sulfone (dapson) in lipopolysaccharide-treated spleen cells: selective inhibition of inflammation-related cytokines. *Korean J Vet Res* 2015, **55**, 199-204.
12. Park Y, Choi HS, Lee HS, Suh HJ. Hematopoietic effect of deer antler extract fermented by *Bacillus subtilis* on murine marrow cells. *Nutr Res Pract* 2015, **9**, 451-458.
13. Ross DD, Joneckis CC, Ordóñez JV, Sisk AM, Wu RK, Hamburger AW, Nora RE. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res* 1989, **49**, 3776-3782.
14. Shim JW, Kim NJ, Kim YS, Kim DH. Anti-fatigue and hepatoprotective effects of fermented antler. *Korean J Pharmacogn* 2012, **43**, 54-58.
15. Suh JS, Eun JS, So JN, Seo JT, Jhon GJ. Phagocytic activity of ethyl alcohol fraction of deer antler in murine peritoneal macrophage. *Biol Pharm Bull* 1999, **22**, 932-935.
16. Sui Z, Zhang L, Huo Y, Zhang Y. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties. *J Pharm Biomed Anal* 2014, **87**, 229-240.
17. Wu F, Li H, Jin L, Li X, Ma Y, You J, Li S, Xu Y. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 2013, **145**, 403-415.
18. Zha E, Li X, Li D, Guo X, Gao S, Yue X. Immunomodulatory effects of a 3.2 kDa polypeptide from velvet antler of *Cervus nippon* Temminck. *Int Immunopharmacol* 2013, **16**, 210-213.