J Korean Soc Food Sci Nutr
46(3), 306~313(2017)

한국식품영양과학회지
https://doi.org/10.3746/jkfn.2017.46.3.306

복분자 자죽염의 마우스 대식세포주 및 복강 대식세포에 대한 면역증진 효과

박희전[1*] · 김석호[2*] · 정소희[1] · 박희란[1] · 김진형[2,3] · 송지영[1]

[1](재)베리앤바이오식품연구소
[2]주식회사 노터스 생명과학 바이오 식품 연구부
[3]주식회사 노터스

Immunostimulatory Effects of Purple Bamboo Salts Composed with *Rubus coreanus* in Raw264.7 Cells and Mouse Peritoneal Macrophages

Heejeon Park[1*], Sokho Kim[2*], Sohee Jeong[1], Heeran Park[1], Jin-Hyung Kim[2,3], and Jiyoung Song[1]

[1]Berry&Biofood Research Institute
[2]Department of Biofood Research, Knotus Life Science Inc.
[3]Knotus Co., Ltd.

ABSTRACT Purple bamboo salt (PuBS) is commonly used as a medicinal food in Korea and has beneficial potentials such as antioxidant and anti-inflammatory effects. *Rubus coreanus* is called Bokbunja, which is used as a traditional medicine for treating asthma, impotence, and allergic diseases in Korea. The aim of present study was to investigate the immunostimulatory effect of PuBS composed with *Rubus coreanus* (PuBS-R). We performed comparative analysis between PuBS and PuBS-R in Raw264.7 cells, which is a mouse macrophage cell line, and peritoneal macrophages isolated primarily from the mouse peritoneal cavity. We evaluated cytotoxicity and the immune cytokine response in PuBS- and PuBS-R-treated cells. Both PuBS and PuBS-R did not have any cytotoxicity in Raw264.7 cells up to 500 μg/mL. Gene and protein levels of immune cytokines such as tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ), interleukin (IL)-10, and IL-12 were significantly elevated by PuBS-R more than PuBS in Raw264.7 cells. Moreover, we evaluated the immunostimulatory effects of PuBS-R on mouse primary peritoneal macrophages. Protein levels of inducible nitric oxide synthase, TNF-α, IFN-γ, IL-10, and IL-12 were significantly higher in PuBS-R-treated peritoneal macrophages than PuBS-treated peritoneal macrophages. These results suggest the potential immunostimulatory effect of PuBS-R for immunity against harmful infection.

Key words: *Rubus coreanus*, purple bamboo salt, macrophage, immune cytokine, immunostimulatory

서 론

외계환경에 대한 생체의 방어능력인 면역력의 중요성은 최근 전 세계적으로 유행한 급성호흡기증후군, 조류독감, 에볼라 등의 등장으로 더욱 대두하고 있다. 외계환경의 부조화 및 생체 항상성의 교란, 병원체의 침입과 같은 외부 위협에 의한 생체 방어능력인 면역력은 외부자극에 가장 먼저 반응하는 비특이적 면역과 특정 병원체가 생체의 최초 방어선을 뚫고 침입하면 이를 항원으로 인식하여 선별적으로 제거하는 특이적 면역이 있다(1). 대식세포(macrophage)나 자연살해세포(natural killer cell), 호중구(neutrophil), 단핵구(monocyte) 등의 비특이적 면역은 가장 먼저 인체를 병원균들로부터 방어하는 선천 면역의 주요 세포들이다(2). 특히 대식세포는 병원체가 상피세포 장벽을 침투하였을 시 생체 방어에 있어 최초로 반응하는 세포로 항원제시세포(antigen presenting cell)로서의 기능도 수행하며, 특이적 면역과 관련하여 T세포 반응에 영향을 미친다(3). 더불어 병원체에 감염되어 정상적인 기능을 상실한 세포나 암세포 등도 제거하고, 면역반응을 높이는 산화질소(nitric oxide; NO)와 tumor necrosis factor-α(TNF-α)와 같은 사이토카인(cytokine) 등을 분비하기도 한다(4).

따라서 최근에는 생체의 특이적 면역이 반응하기 전에 침입한 병원체를 신속하게 제거할 수 있는 선천성 면역기능과 관련하여 그중 가장 많은 역할을 하고 있는 대식세포를 활성화시키는 천연물질의 연구가 활발히 진행되고 있다. 관련 연구 중 현재 보고된 것들의 예를 들면 천연물 추출물을 처리한 Raw264.7 대식세포주에서 면역증강 효과 연구(4), 사과씨 에탄올 추출물의 대식세포 활성에 미치는 영향 연구(5),

Received 8 December 2016; Accepted 17 February 2017
Corresponding author: Jiyoung Song, Berry & Biofood Research Institute, Jeonbuk 56417, Korea
E-mail: jysong@gbri.re.kr, Phone: +82-63-560-5152
*These authors contributed equally to this work.

울금이 면역조절에 미치는 영향 연구(6) 등이 있다. 대식세포의 표면에는 immunoglobulin G의 Fc, 보체, interferon(IFN), TNF 및 병원체에 대한 수용체가 존재한다. 먼저 강한 탐식능으로 이물질을 lysomal enzyme, 활성산소매개물, 과산화수소 등으로 제거하고, lactoferrin, lysozyme 등으로도 없앤다. 위의 탐식과정에 제거되지 않은 이물질은 TNF-α, NO 등으로 제거하며, 이후 특이적 면역을 유도하기 위해 탐식된 항원을 적절히 분해하여 T세포에 제시하고, interleukin(IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12 등을 분비하여 면역계를 활성화시킨다(7).

자죽염(purple bamboo salt; PuBS)은 대나무에 소금을 채워 구운 죽염을 용융시켜 재결정시킨 것으로 3년 된 대나무 통에 천일염을 넣고 입구를 황토로 막아 가마에 아홉 번 굽는 것을 반복하여 제조한다. 아홉 번 구워 제조한 자색의 소금이 자죽염이며 주성분은 Na와 Cl이나 미네랄 및 다양한 미량원소를 포함한 유용한 물질로 알려져 있다(8). 특히 자죽염과 관련되어 밝혀진 생체에 이로운 효능은 항염증(9), 항산화(10), 구강 내 세균증식 억제(11), 치은염 감소(12), 대장암 세포 증식 억제(8) 등이 보고되어 있다.

복분자(*Rubus coreanus*)는 장미과의 식물로 우리나라 중부 이남에서 자라는 높이 2~3 m의 식물이다. 5~6월에 꽃이 피며 7~8월에 열매가 성숙되어 붉은색에서 흑색으로 완숙된다(13). *Rubus* 속에 속하는 식물 종류는 red raspberry, purple raspberry, black raspberry 등이 있다(14). 현재 당뇨병, 성욕감퇴, 정액루, 유뇨증, 천식 및 알레르기 관련 질병에 효능이 있는 것으로 보고되었다(15). 또한, 외래종 복분자로 알려진 *Rubus occidentalis*가 항염증 효과가 있는 것으로 밝혀져 국내 토종 복분자와의 비교 연구(13)를 통해 생체의 면역계통에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제시하였다.

현재까지 자죽염 및 복분자와 관련해 비특이적 면역의 주요한 인자인 대식세포와 관련하여 면역자극 및 증강에 대한 연구는 진행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 복분자를 혼입해 제조한 복분자 자죽염(PuBS-R)이 대식세포의 활성에 미치는 영향을 연구할 뿐만 아니라, 일반 자죽염(PuBS)과 그 효능을 비교 평가하고자 한다.

재료 및 방법

시험 시료

비교 평가를 위해 사용된 PuBS와 PuBS-R은 전북 고창에서 생산되고 가공된 제품을 (주)태성식품(고창, 한국)으로부터 제공받았다. PuBS는 천일염 100%로 제조되었으며 구성비상 NaCl 93% 이상인 것을 사용하였다. PuBS-R은 PuBS 60%, 복분자 분말 25%, 삼백초, 곽향, 단삼, 감초, 오가피, 현미를 동량 추출한 혼합물 15%로 구성된 환제품을 사용했다. 세포에 처리하기 위해 실험 농도에 맞춰 증류수에 희석해 사용했다. 양성대조군으로 사용하기 위한 lipopolysaccharide (LPS)는 *Escherichia coli*에서 분리한 것으로 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포 배양

Raw264.7 세포는 마우스 기원의 대식세포주로서 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용했다. Peritoneal macrophage를 분리하기 위해 C57BL/6 마우스는 8주령 수컷 10마리를 사용하였으며, 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10~20회/h, 조명시간 12시간(오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 (주)노터스생명과학 실험동물실에서 사양하였다. 모든 동물은 (주)노터스생명과학의 실험동물 윤리위원의 승인 및 허가에 따라 사용되었으며, 실험동물 사용 및 관리에 따른 국제 기준을 준수하였다(KLS-2016008). Peritoneal macrophage는 C57BL/6 마우스 복강에 3% thioglycollate(Sigma-Aldrich Co.)를 주입하고, 4일 뒤 경추 탈골하여 희생시킨 다음 복강에 인산완충용액(PBS; Sigma-Aldrich Co.)을 넣어 peritoneal macrophage를 분리하였다. 분리된 macrophage는 세척하여 배양 배지로 부유한 후 실험에 사용하였다. 세포의 배양을 위하여 10% 열불활화한 우태아혈청(Wellgene, Seoul, Korea)과 1% penicillin 및 streptomycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Wellgene) 배양액에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였고, 2일마다 배지를 교환하였으며, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 계대 배양하였다.

세포 증식률

PuBS와 PuBS-R이 Raw264.7 세포에 미치는 잠재적인 독성이나 영향을 평가하기 위해 세포 증식률을 평가하였다. Raw264.7 세포를 10% FBS와 1% penicillin+ streptomycin이 포함한 DMEM에 현탁 후, 48-well plate에 5×10^5 cells/well의 밀도로 분주한 뒤 24시간 동안 안정화시켰다. 안정화 후 배양배지를 이용하여 처리 시험물질을 조제한 다음 세포에 처리하였다. 배지를 제거하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-tetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich Co.)를 0.5 mg/mL 농도로 처리 후 2시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 후, formazan 결정을 dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich Co.) 용액으로 용해한 후, Epoch 2 Microplate-Reader(BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 흡광도(540 nm)를 측정하였다. LPS와 시험물질이 처리되지 않은 조건에서 배양한 대조군을 기준으로 시험물질 처리군의 세포 증식률(%)을 계산하였다.

유전자 분석

TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-10 등 사이토카인의 발현에 미치는 효과를 유전자 단위에서 확인하기 위하여 real time

Table 1. Gene primer sequences

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Position cDNA	Gene Bank ID
TNF-α	FP: CAA CAT ACT GCT AAC CGA CTC CT	253-275	NM_010548
	RP: TGA GGG TCT TCA GCT TCT CAC	405-425	
IFN-γ	FP: GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA	792-811	NM_008352
	RP: AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG	948-971	
IL-12	FP: CGT CGT AGC AAA CCA CCA AG	438-457	NM_013693
	RP: TTG AAG AGA ACC TGG GAG TAG ACA	564-587	
IL-10	FP: CAG CAA CAA CAT AAG CGT CA	370-389	NM_008337.3
	RP: CCT CAA ACT TGG CAA TAC TCA	450-470	
GAPDH	FP: CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA	776-795	NM_001289726.1
	RP: CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA	859-879	

RT-PCR(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 수행하였다. TRIzol 시약(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 Total RNA를 분리한 후 Nano drop(Thermo, Waltham, MA, USA)을 이용하여 mRNA를 정량하였다. 정량 후 동일한 농도(100 ng/μL)의 RNA를 random primer를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 각각의 샘플을 cDNA synthesis kit(TOYOBO, Osaka, Japan)을 처리해 37°C에서 15분, 50°C에서 5분, 98°C에서 5분간 PCR(Bio-Rad)에서 반응시켰다. 역전사된 cDNA를 이용하여 target cytokine의 유전자 발현을 real time RT-PCR을 이용하여 확인하였다. Wizbiosolution (Seongnam, Korea)의 SYBR을 각각의 샘플에 처리하여 95°C에서 5분, 그리고 10초 반응시킨 뒤 60°C에서 20초 반응시키는 것을 총 40회 반복 증폭하였다. Melt curve는 65°C에서 95°C 사이로 확인하였다. 실험에 사용된 primer의 염기서열은 Table 1에 기재하였다.

사이토카인 단백질 분석

PuBS와 PuBS-R이 Raw264.7 세포 및 peritoneal macrophage의 면역증강에 미치는 영향을 확인하기 위해 상기 언급한 실험구성으로 배양한 세포의 상층액을 회수한 후 면역관련 사이토카인을 확인하였다. 회수한 세포 상층액은 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 깨끗한 상층액만을 취득하였다. 취득한 상층액에서 TNF-α, IFN-ɣ, IL-12, IL-10, 그리고 inducible nitric oxide synthase(iNOs)의 분비량을 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) kit(eBioscience, San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. 간략히 설명하자면 각각의 kit에 포함된 항체 코팅된 96-well plate에 50 μL의 샘플을 처리한 후, assay buffer 50 μL를 처리했다. Biotin-Conjugate solution을 각 well에 50 μL씩 처리한 후 빛이 차단된 상온에서 2시간 반응시켰다. 3번 세척한 후 Streptavidin-HRP solution을 100 μL씩 처리해 빛이 차단된 상온에서 1시간 반응시켰다. 3번 세척 후 TMB solution 100 μL를 10분 동안 반응시킨 다음, stop solution을 100 μL 처리하여 반응을 멈추게 하고 Epoch 2 Microplate-Reader(BioTek)를 사용해 450 nM에서 흡광도를 확인하였다.

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 paired T-test로 분석하였으며, 실험군 간의 유의성은 $P<0.05$ 수준에서 비교하였다.

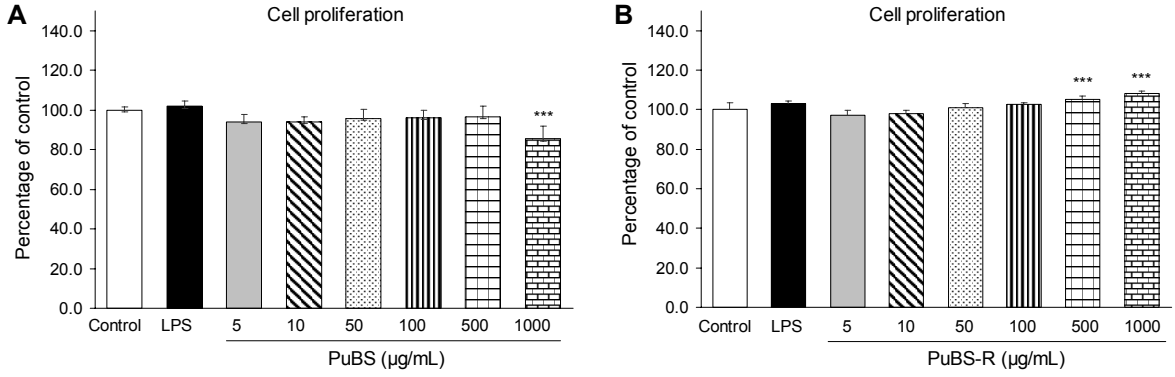

Fig. 1. Effect of PuBS and PuBS-R on the proliferation of Raw264.7 cells. Cells in 48-well plate (5×10^5 cells/well) were treated with the indicated concentration of (A) PuBS, (B) PuBS-R (5, 10, 50, 100, 500, and 1,000 μg/mL), or LPS (1 μg/mL) for 24 h. Percentage of control means (sample O.D value 540 nm/control O.D value 540 nm)×100. A significant difference at $^{***}P<0.001$ level compared to the control.

결과 및 고찰

세포 독성 및 증식률 평가

세포에 처리할 PuBS와 PuBS-R의 최적 농도를 결정하기 위해 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1). PuBS와 PuBS-R을 5~1,000 μg/mL 농도로 Raw264.7 세포에 24시간 동안 처리한 결과 PuBS의 경우 500 μg/mL까지 이렇다 할 세포 독성을 보여주지 않다가 1,000 μg/mL 농도 처리 시 정상대조군에 비해 낮은 세포 증식률로서 독성을 보였다(Fig. 1A). 그러나 PuBS-R을 처리한 세포의 경우 오히려 500 μg/mL 이상 처리 시 세포가 유의하게 증식하는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이것은 고농도의 NaCl을 함유한 PuBS보다 PuBS-R이 대식세포에 미치는 악영향이 적다는 것뿐만 아니라 대식세포의 증식에도 도움을 준다는 것을 나타낸다. 이 실험 결과에 따라 이후 실험에선 공통적으로 50, 100, 500 μg/mL 농도로 PuBS와 PuBS-R을 처리하였다.

대식세포주에서 면역 관련 사이토카인 유전자 변화

앞서 실험에서 정한 농도대로 PuBS와 PuBS-R을 처리한 Raw264.7 세포에서 mRNA를 분리하여 분석하였다. TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-10을 확인하였다(Fig. 2). 선천성 면역반응의 중요 인자로 여겨지는 TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-10 등과 같은 사이토카인은 대식세포가 활성화되면 발현이 증가하게 되고 이를 통해 다른 면역세포들의 면역 반응을 촉진시키는 역할을 하게 된다. TNF-α는 대식세포 및 Th1 세포로부터 생성되는 사이토카인으로 단핵구 및 다른 면역세포를 자극하여 백혈구의 유주 및 보충 등에 중요한 역할을 하는 chemokine을 분비하게 해 백혈구의 활성을 통해 병원체를 제거한다(16). IFN-γ는 T세포에 작용하여 Th1세포(T helper 1 cell)의 분화를 촉진시킴과 동시에 Th2세포(T helper 2 cell)의 증식을 억제하여 미생물성 병원체의 침입 시 최전선에서 방어하는 사이토카인이다(17). IFN-γ는 T세포, B세포, 호중구, 자연살해세포, 혈관내피세포에 작용하여 활성화시킬 수 있으며, 대식세포활성화 인자로 작용하여 MHC class Ⅰ, Ⅱ 발현을 증가시키기도 한다. IL-12와 IL-10 등은 NO 같은 염증 관련 인자의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, IL-12의 경우 대식세포주에서 주로 생성되어 다른 면역세포, 주로 면역반응 초기에 자연살해세포와 T세포에 작용하여 IFN-γ의 생산을 유도하는 세포성 면역작용을 한다(18). IL-10의 경우 Th1세포에서 생산되는 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 생산을 억제하여 여러 가지 면역관련 사이토카인 생성 균형을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(19). 이들 사이토카인 발현에 미치는 효과를 측정하기 위하여 다음과 같은 실험군에서 유전자를 분석하

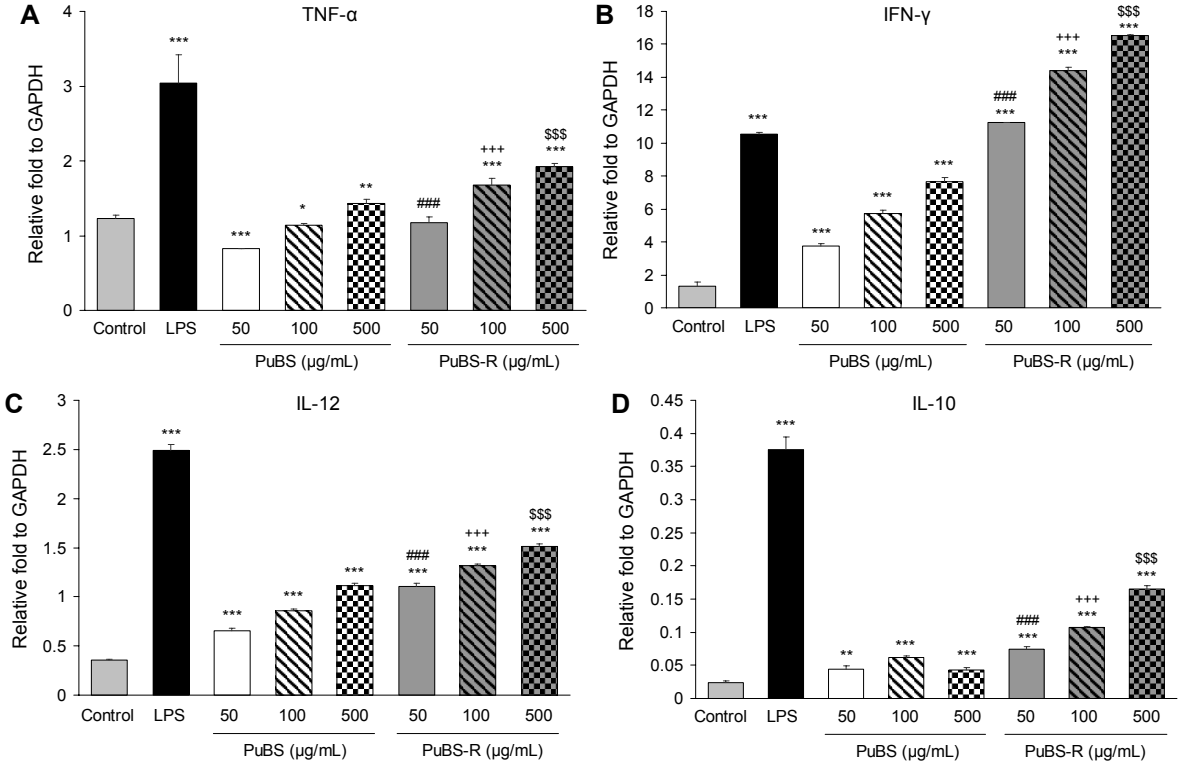

Fig. 2. Stimulatory effect of PuBS and PuBS-R on the expression of cytokine (A) TNF-α, (B) IFN-γ, (C) IL-12, and (D) IL-10 mRNA levels in Raw264.7 cells. The levels of mRNAs for cytokines were determined by real time RT-PCR using total RNA extracted from Raw264.7 cells treated with the indicated concentrations of PuBS, PuBS-R (50, 100, and 500 μg/mL), or LPS (1 μg/mL) for 24 h. A significant difference at $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ level compared to the control. A significant difference at $^{\#\#\#}P<0.001$ level compared to the PuBS (50 μg/mL). A significant difference at $^{+++}P<0.001$ level compared to the PuBS (100 μg/mL). A significant difference at $^{\$\$\$}P<0.001$ level compared to the PuBS (500 μg/mL).

였다. 어떤 처리도 하지 않은 정상대조군(control), LPS만을 처리한 양성대조군, PuBS와 PuBS-R을 농도별로 처리한 실험군이 발현하는 사이토카인을 real time RT-PCR을 통하여 측정하였다. Fig. 2에서 확인할 수 있듯이 TNF-α는 정상대조군보다 LPS를 처리한 양성대조군에서 3배 많은 양의 TNF-α를 발현하였다. PuBS의 경우 50, 100 μg/mL 농도 처리 시 오히려 유의하게 감소하는 경향을 보였고, 500 μg/mL 처리 시 유의하게 증가하는 것이 확인되었다. PuBS-R의 경우 100 μg/mL 이상 처리 시 정상대조군보다 유의하게 증가하였고, 같은 농도의 PuBS 처리 군과 비교 시에도 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. IFN-γ의 경우 정상대조군보다 모든 실험군에서 농도 의존적으로 발현이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. PuBS와 PuBS-R 군끼리 같은 농도에서 비교 시 PuBS-R 군이 유의하게 높게 발현하는 결과를 보였다. 이것은 IL-12와 IL-10에서도 동일한 유전자 발현 경향을 보였고, 따라서 Raw264.7 세포에서 PuBS-R은 농도 의존적으로 각각의 면역 유도 유전자 발현을 증가시켰으며, 그 증가는 같은 농도의 PuBS와 비교 시에 우월한 것으로 나타났다.

대식세포주에서 면역 관련 사이토카인 단백질 변화

상기 확인한 유전자 실험과 같은 세포 실험군에서 분리한 단백질로 실험을 진행하였다. 확인한 유전자종과 같이 TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-10 등의 단백질 생성량을 평가하였다. Fig. 3에서 확인할 수 있듯이 전반적인 경향은 각각의 유전자 발현과 비슷한 양상을 보였다. TNF-α의 경우 PuBS-R 500 μg/mL 처리 시 가장 높은 단백질 발현 정도를 보여줬으며, PuBS-R을 처리한 군이 같은 농도의 PuBS를 처리한 군보다 유의하게 높은 단백질 생성량을 보였다. IFN-γ, IL-10 등도 TNF-α와 같은 경향을 보였다. IL-12 단백질의 경우 PuBS 50과 100 μg/mL 농도를 처리한 군에서는 정상대조군과 유의한 차이를 보이지 않았고, PuBS-R 50 μg/mL를 처리한 군도 정상대조군과는 유의한 생성량 차이가 없었으나 같은 농도의 PuBS를 처리한 군과 비교 시 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 Raw264.7 세포에 PuBS-R이 면역 관련 사이토카인에 미치는 영향이 유전자 단계 평가와 동일하다는 것을 나타내며, 앞선 결과의 신뢰성을 더해주었다.

Peritoneal macrophage에서 면역 관련 사이토카인 단백질 변화

대식세포주에서 실험한 결과를 바탕으로 C57BL/6 마우스의 복강에서 분리한 대식세포를 초대 배양해 PuBS와 PuBS-R이 미치는 영향을 평가했다. Fig. 4에서 확인할 수 있듯이 대식세포주에서 확인했던 결과와 비슷한 경향을 확

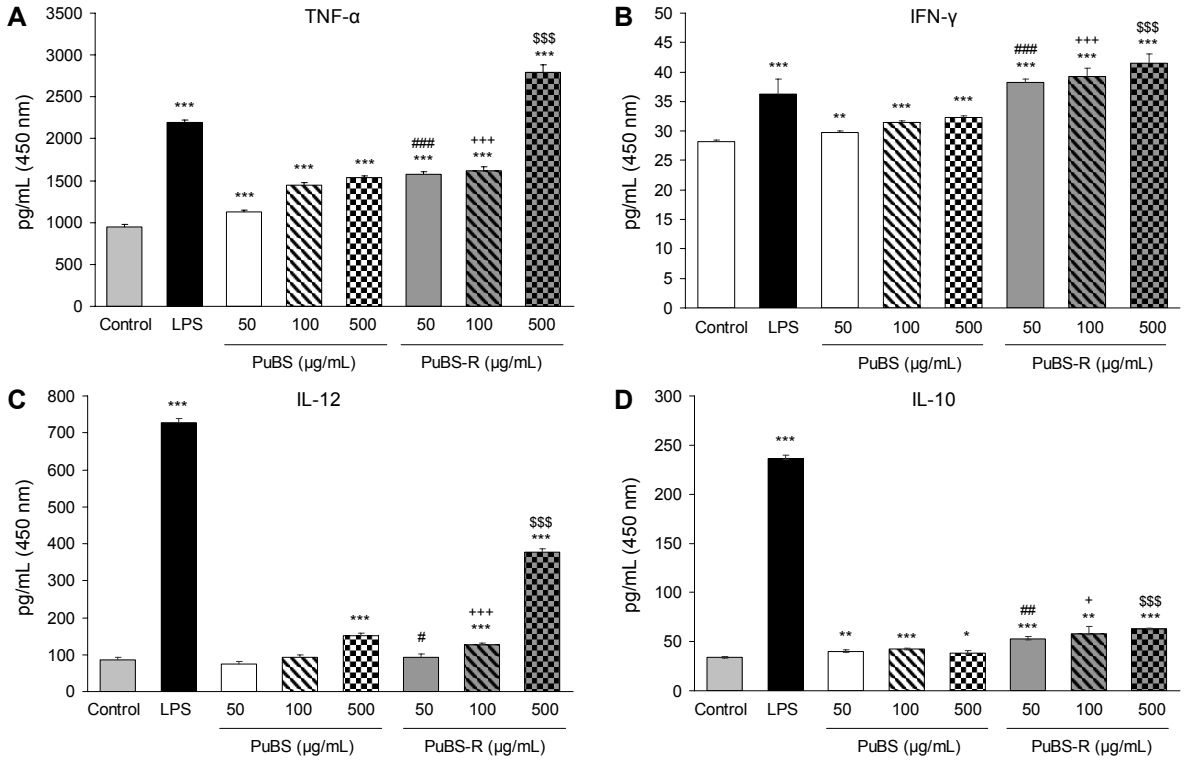

Fig. 3. Stimulatory effect of PuBS and PuBS-R on the cytokine production of (A) TNF-α, (B) IFN-γ, (C) IL-12, and (D) IL-10 in Raw264,7 cells. Raw264.7 cells were treated with the indicated concentrations of PuBS, PuBS-R (50, 100, and 500 μg/mL), or LPS (1 μg/mL) for 24 h. Culture supernatants were then isolated and analyzed using ELISA kit for cytokines. A significant difference at $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ level compared to the control. A significant difference at $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$ level compared to the PuBS (50 μg/mL). A significant difference at $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$, $^{+++}P<0.001$ level compared to the PuBS (100 μg/mL). A significant difference at $^{\$\$\$}P<0.001$ level compared to the PuBS (500 μg/mL).

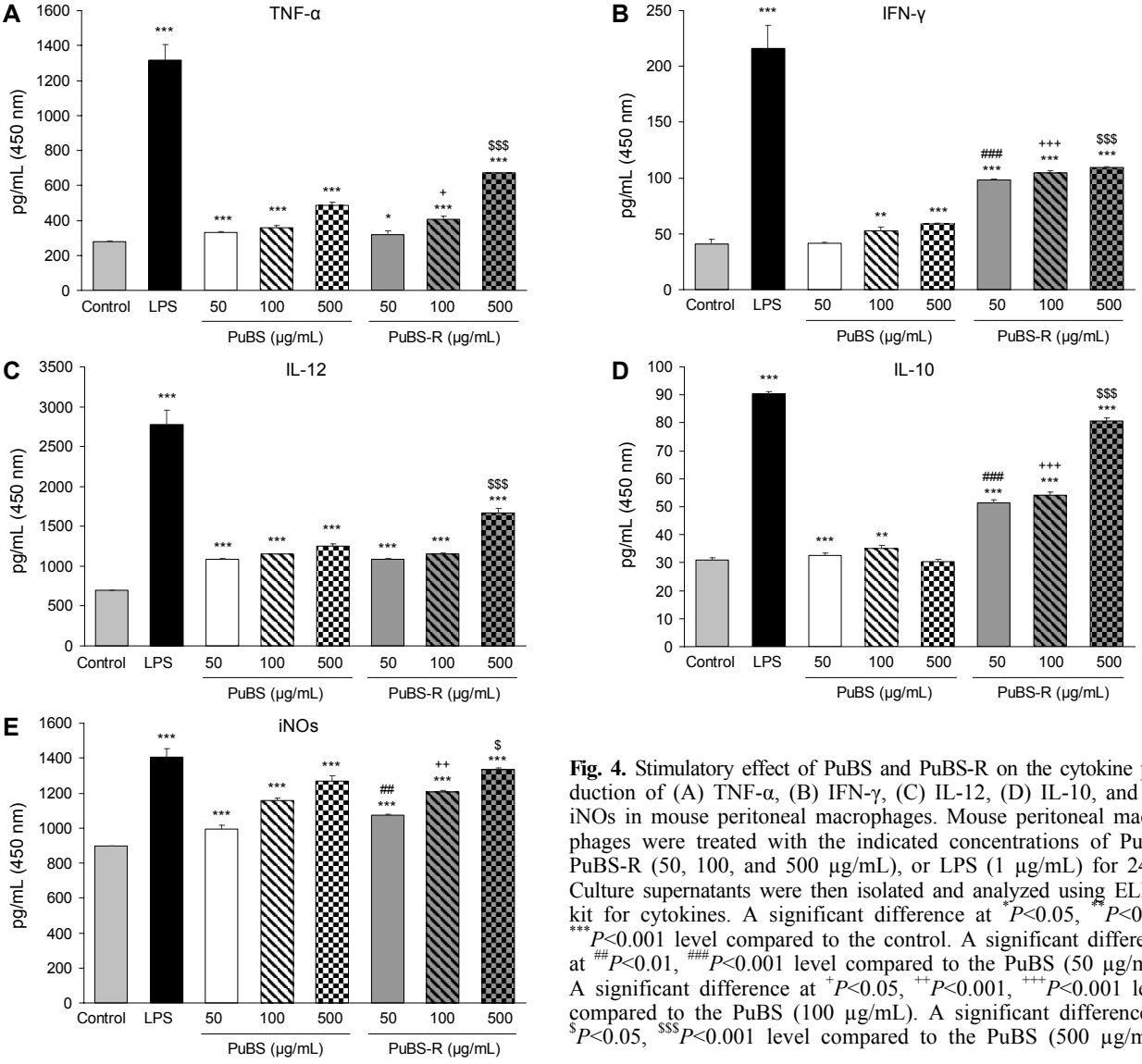

Fig. 4. Stimulatory effect of PuBS and PuBS-R on the cytokine production of (A) TNF-α, (B) IFN-γ, (C) IL-12, (D) IL-10, and (E) iNOs in mouse peritoneal macrophages. Mouse peritoneal macrophages were treated with the indicated concentrations of PuBS, PuBS-R (50, 100, and 500 μg/mL), or LPS (1 μg/mL) for 24 h. Culture supernatants were then isolated and analyzed using ELISA kit for cytokines. A significant difference at $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ level compared to the control. A significant difference at $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$ level compared to the PuBS (50 μg/mL). A significant difference at $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.001$, $^{+++}P<0.001$ level compared to the PuBS (100 μg/mL). A significant difference at $^{\$}P<0.05$, $^{\$\$\$}P<0.001$ level compared to the PuBS (500 μg/mL).

인할 수 있었다. TNF-α, IFN-ɣ, IL-12, IL-10, iNOs 등의 면역 관련 사이토카인을 단백질 단위에서 확인하였다. 당연하게도 대식세포주에서 실험했을 때와 유사한 경향을 보였지만 IFN-ɣ, IL-12 등의 특정 단백질 발현량 절대값이 대식세포주에서 실험한 결과값과 비교해볼 때 초대 배양한 peritoneal macrophage에서 더 높았다. 이것은 아마도 생체 내에서 바로 분리한 대식세포에 PuBS와 PuBS-R이 더 민감하게 작용하여 자연살해세포를 포함하는 2차 비특이적 면역계에 신속히 영향을 미칠 것으로 생각된다. TNF-α는 PuBS와 PuBS-R 모두 50, 100, 500 μg/mL 농도 전 구간에서 정상대조군보다 높게 발현되었다. IFN-ɣ는 PuBS 50 μg/mL 처리 시 정상대조군과 차이가 없었고, PuBS-R을 처리한 군이 같은 농도를 처리한 PuBS 처리군보다 두 배 이상 높게 발현되었다. IL-12의 경우 모든 실험군에서 전반적으로 증가하였고, PuBS-R 500 μg/mL 처리한 군만이 같은 농도의 PuBS를 처리한 군보다 높은 결과값을 보였다. IL-10에서는 50, 100 μg/mL 농도의 PuBS 처리군만이 정상대조군보다 높은 IL-12 생성량을 보였다. PuBS-R을 처리한 군은 정상대조군보다 두 배 이상 높은 생성량을 보였으며, 이것은 PuBS를 같은 농도 처리한 군과 비교해서도 마찬가지였다. 마지막으로 우리는 iNOs의 생성량을 확인하였다. 앞서 설명했다시피 대식세포에 면역 자극성 물질을 처리하면 TNF-α, IFN-ɣ, IL-12, IL-10 등의 사이토카인과 NO와 같은 염증 관련 인자의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(19). 특히 NO는 free-radical로서 산화력을 가지고 있으며, 심혈관계, 신경계 및 면역계의 전달 물질로서 세포 내 항상성 유지, 신경전달 물질의 운반, 항암작용 등의 기능을 한다(20). 이것이 과량 생성되면 심각한 염증을 유발하여 생체에 여러 악영향을 유발할 수 있으나, 정상 범위에서 벗어나지 않는 NO 생성은 비특이적 면역의 중요한 인자로 여겨진다(21). 따라서 본 연구에서는 이러한 NO를 생산하는 인자인 iNOs의 생성량을 ELISA 실험을 통해 peritoneal

macrophage에서 확인하였다. 다른 면역 관련 사이토카인과 같이 PuBS와 PuBS-R을 처리한 모든 군에서 정상대조군보다 유의하게 증가하였으며, PuBS와 PuBS-R을 비교하였을 시에도 PuBS-R을 처리한 군이 PuBS를 같은 농도로 처리한 군보다 유의하게 증가하였다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 전통적으로 기능성 식품 또는 약으로 사용된 자죽염과 복분자를 조합한 복분자 자죽염, PuBS-R이 비특이적 면역의 초기 반응 세포인 대식세포에 있어 빠르고 높은 면역 반응을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 기존의 일반적인 자죽염, PuBS 역시 대식세포를 자극하여 면역 관련 사이토카인을 유도하고 증가시켰지만 그 정도가 PuBS-R에 비해 낮았고, 복분자를 조합한 PuBS-R이 세포의 정상적인 증식에서도 안전하다는 결과를 확인 가능했다.

요 약

본 연구에서는 전통적인 기능성 식품이자 의약품으로 사용되었던 자죽염(PubS)과 복분자를 조합한 복분자 자죽염(PuBS-R)을 사용해 비특이적, 선천성 면역에 중요한 역할을 하는 대식세포에서의 영향을 확인하였다. PuBS-R은 마우스 대식세포인 Raw264.7 세포에서 1,000 μg/mL 농도 처리 시 세포의 증식을 유발하였으며, 그에 반해 PuBS를 1,000 μg/mL 처리 시 유의하게 세포 증식률이 억제되었다. 이어서 면역 관련 사이토카인 TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-10 등을 유전자 단계와 단백질 단계에서 평가하였다. 그 결과 PuBS-R은 50, 100, 500 μg/mL에서 유의한 증가율을 보였고, 무엇보다 이것은 PuBS 군에 비해서도 월등한 증가율을 확인할 수 있었다. 마지막으로 마우스의 복강에서 분리한 peritoneal macrophage에 PuBS-R을 처리 후 TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-10, iNOs를 단백질 단계에서 평가한 결과, Raw264.7 세포에서 얻은 결과와 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보아 PuBS-R은 인체의 대식세포 활성의 증가를 통해 비특이적, 선천성 면역력을 증가시킬 것으로 판단되며, 이러한 결과를 바탕으로 추후 실험동물을 이용한 *in vivo* 후속 연구를 통해 PuBS-R의 면역증강 기능성 식품 개발이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 “복분자 장어푸드테라사업단”의 “푸드테라피연구사업” 과제에 의해 이루어진 것이며, 본 연구를 잘 수행할 수 있게 도와주신 박우정 이사장님과 문규환 소장님, 주식회사 노터스 생명과학에 감사드립니다. 좋은 연구 시료를 제공해 주신 주식회사 삼보죽염에도 감사를 표합니다.

REFERENCES

1. London NR Jr, Tharakan A, Ramanathan M Jr. 2016. The role of innate immunity and aeroallergens in chronic rhinosinusitis. *Adv Otorhinolaryngol* 79: 69-77.
2. Locati M, Mantovani A, Sica A. 2013. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol* 120: 163-184.
3. Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerdt S. 2001. Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance. *Hautarzt* 52: 193-200.
4. Ortiz-Andrellucchi A, Sánchez-Villegas A, Rodríguez-Gallego C, Lemes A, Molero T, Soria A, Peña-Quintana L, Santana M, Ramírez O, García J, Cabrera F, Cobo J, Serra-Majem L. 2008. Immunomodulatory effects of the intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* DN114001 in lactating mothers and their children. *Br J Nutr* 100: 834-845.
5. Byun MW. 2013. Immunomodulatory activities of apple seed extracts on macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1513-1517.
6. 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.
7. Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. 2012. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J Plant Res* 25: 299-307.
8. Zhao X, Song J, Lee JH, Kim SY, Park KY. 2010. Antioxidation and cancer cell (HT-29) antiproliferation effects *Rubus coreanus* Miquel bamboo salt. *Cancer Prev Res* 15: 306-312.
9. Shin HY, Lee EH, Kim CY, Shin TY, Kim SD, Song YS, Lee KN, Hong SH, Kim HM. 2003. Anti-inflammatory activity of Korean folk medicine purple bamboo salt. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 25: 377-384.
10. Huh K, Kim YH, Jin DQ. 2001. Protective effect of an aged garlic-bamboo salt mixture on the rat with the alcohol-salicylate induced gastropathy. *Yakhak Hoeji* 45: 258-268.
11. Sohn WS, Yoo YC, Kim CR. 1991. The effect of NaCl and bamboo salt on the growth of various oral bacteria. *J Korean Acad Oral Health* 15: 255-268.
12. Kim CY, Chung SC, Sohn WS. 1991. Comparison of the anti-plaque and anti-inflammatory effect of the dentifrices containing NaCl and bamboo salt. *J Korean Acad Oral Health* 15: 269-280.
13. Yang HM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. 2007. Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Korean J Food Sci Technol* 39: 342-347.
14. Cha HS, Lee MK, Hwang JB, Park MS, Park KM. 2001. Physiocochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1021-1025.
15. Moon GS. 1991. *Constituents and uses of medicinal herbs*. Ilweolseogak, Seoul, Korea. p 310-311.
16. Kiemer AK, Vollmar AM. 2001. The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. *Ann Rheum Dis* 60: iii68-iii70.
17. Chang TT, Stevens SR. 2002. Atopic dermatitis: the role of recombinant interferon-gamma therapy. *Am J Clin Dermatol* 3: 175-183.
18. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O’Shea JJ. 2003. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive im-

mune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 361-368.
19. Kang BK, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Kim M, 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.
20. Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705-707.
21. 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.