

누에 복합 추출물의 면역 활성화 증진 효과

이아름^{1#}, 김수현¹, 김수지¹, 김경조¹, 이영철², 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 상지대학교 한의과대학 본초학교실

Evaluation of Immunopotential Activities of Combined Extract of Silkworm and Food material

AhReum Lee^{1#}, SooHyun Kim¹, SuJi Kim¹, KyeongJo Kim¹,
Young-Cheol Lee², Seong-Soo Roh^{1*}

1 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : College of Korean Medicine, Sangji University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Silkworm is known as immunomodulatory substances and contain various bioactive compounds such as serine, tyrosine and alanine. The aim of this study was to investigate the immunopotentiating activity of combined extract of silkworm and food materials (*Eucommia ulmoides*, *Angelica gigas*, *Acanthopanax*, *Allium hookeri*, *Cinnamomum cassia*, *Liriope platyphylla*, *Curcuma longa*, *Achyranthes japonica*, *Alpinia oxyphylla*, *Adenophora triphylla*).

Methods : Among 10 kinds of food materials, to select food materials with the effect of enhancing the immune function mouse splenocyte proliferation ability was measured by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Then, combined extract of silkworm and food materials were evaluated that mouse splenocyte proliferation ability by EZ-cytox cell viability assay. Moreover, cytokines production such as IL-2, IL-4, IL10, IL12, IFN- γ on mouse T lymphocyte stimulated with concanavalin A (ConA) was measured.

Results : *Eucommia ulmoides*, *Acanthopanax*, *Allium hookeri*, *Cinnamomum cassia*, *Liriope platyphylla* has high proliferation ability of mouse splenocyte compared with *Curcuma longa*, *Achyranthes japonica*, *Alpinia oxyphylla*, *Adenophora triphylla*. The silkworm and food material combined extract has a relatively high proliferation ability of mouse splenocyte proliferation when the silkworm and food materials are used as a single material. In particular, combined extract of silkworm and *Cinnamomum cassia* was stimulate cytokine production on T lymphocyte such as IL12, IFN- γ . Combined extract of silkworm and *Liriope platyphylla* was stimulate cytokine production on T lymphocyte such as IL2, IL4, IL10.

Conclusion : In conclusion, the combined extract of the silkworm and *Cinnamomum cassia* or *Liriope platyphylla* may enhance immune function by regulating mouse splenocyte proliferation and stimulating cytokine production.

Key words : Silkworm, Food material, Mouse splenocyte, T lymphocyte, Immunopotential activities.

I. 서 론

누에 (*Bombyx mori* L.)는 혈당강하용 건강기능식품 소재로 널리 쓰이고 있으며¹⁾ 대체적으로 5령 3일 (부화 후 19일) 누

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2296 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Ah Reum Lee, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : rmi2222@naver.com

· Received : 11 June 2017 · Revised : 21 June 2017 · Accepted : 15 July 2017

에를 열수 또는 수증기로 익히고 난 후 분말로 제조하여 사용한다²⁾. 약리적으로는 소장의 당분해효소 α -glucosidase 억제 작용에 기인한다는 보고가 있고³⁾, 피부미용⁴⁾, 간기능개선⁵⁾, 면역력 증강⁶⁾, 피로회복⁷⁾에 좋은 것으로 알려져 있다. 또한 누에는 단백질을 67% 이상 함유한 고단백 식품으로 serine, tyrosine, aspartic acid, alanin, mrcacin 등이 대표적인 약리 성분이다⁸⁾.

최근 식용으로 이용되고 있는 천연식품을 소재로 면역 활성 증진 효과를 검증하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다⁹⁾. 식품의 면역 활성에 관한 연구로는 당귀 추출물^{10,11)}, 오가피 추출물¹²⁾, 맥문동 추출물, 사삼 추출물은 마우스 비장세포와 사이토카인 생성을 증진시키는 것으로 알려져 있으며¹³⁾, 부추는 청소년 시기에 운동과 함께 섭취하였을 때 면역기능이 높아진다는 보고가 있다¹⁴⁾. 또한 강황은 발효유에 첨가하였을 때 면역을 조절하는 효능이 뛰어나다는 연구 결과가 있으며¹⁵⁾ 우슬은 약침으로 사용하였을 때 세포성 면역반응을 조절하여 류마티스 관절염을 개선시킨다는 보고가 있다¹⁶⁾.

본 연구자는 문헌조사를 통하여 면역 활성 증진 효과가 뛰어나다고 알려진 10가지 소재 (두충 (*Eucommia ulmoides*, EU), 당귀 (*Angelica gigas*, AG), 오가피 (*Acanthopanax*, AC), 부추 (*Allium hookeri*, AH), 육계 (*Cinnamomum cassia*, CC), 맥문동 (*Liriope platyphylla*, LP), 강황 (*Curcuma longa*, CL), 우슬 (*Achyranthes japonica*, AJ), 익지 (*Alpinia oxyphylla*, AO), 사삼 (*Adenophora triphylla*, AT))를 선정하여 마우스 비장세포 증식능을 평가하였고 이중 비장세포 증식능이 높은 식품 소재 5종을 선정하여 누에와 복합 추출한 다음 EZ-CyTox법을 사용하여 마우스 비장세포 증식능을 평가하였다. 또한 누에 복합 추출물의 사이토카인 생성량을 평가하여 면역 활성 증진 효과를 비교 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출

본 실험에서 사용한 누에, 당귀, 두충, 오가피, 부추, 육계, 강황, 우슬, 익지, 사삼은 옴니허브 (대구, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실실에서 관능 검사하여 약전규격에 합격한 것만을 정선하여 실험에 사용하였다.

각 시료 100 g을 한일분쇄기 (FM-700SS, 한국)로 분쇄하여 환류추출기 (heating Mantle, MS-DM609/20L)에 넣고 100°C 에서 증류수를 1 l 가하여 120분 추출하였다. 그 후 감압증류기 (N-1200A, EYELA, CO. LTD, Japan)를 이용하여 추출액을 농축하는 과정을 거치고, 동결건조기 (PF-10/ALPHA 1-2LD, Germany)를 통하여 건조된 열수 추출물을 얻어 -20°C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 세포

8주령 Balb/c계 수컷 생쥐를 샘타코 바이오 (Korea, Osan-si)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22±2°C, 습도

50±5% 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 사료는 고형사료 (Samyang corporation, Seoul, Korea) (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다. Balb/c계 수컷 생쥐를 경추 탈골로 희생시킨 뒤 비장을 적출한 다음 적당량의 무균 Hank's balanced salt solution (HBSS; GIBCO, NY, USA) 용액이 담긴 용기에 넣고, 핀셋으로 잘게 절단하여 단일 비장세포 현탁액으로 만든 후, Filter로 여과하여 HBSS액에 세 번 세척하였다. 매 세척 시 1,000 rpm에서 원심 분리하였고, 세포를 배양액 2 ml에 띄워 trypan blue solution으로 염색한 후 hemocytometer를 이용하여 생존 세포 수를 계산하여 실험에 사용하였다.

3. 마우스 비장세포 증식능 측정

1) MTT 법

비장세포 현탁액을 24 well plate에 각 well마다 세포 농도가 2×10^6 ml로 조절하여 1 ml씩 분주하여 배양한 후, 50 μ l의 Con A액 (2 μ g/ml)과 식품 소재 (100, 200, 400 μ g/ml)을 넣는다. 세포는 5% CO₂ 37°C 배양기에서 72시간 배양한다. 배양 종료 4시간 전에 각 well 마다 상등액 0.7 ml를 빼고 fetal bovine serum (FBS; sigma aldrich, MO, USA)를 함유하지 않은 RPMI 1640 배양액 (GIBCO BRL, NY, USA) 0.7 ml를 넣는 동시에 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma aldrich, MO, USA) 용액 (5 mg/ml)을 50 μ l/well의 양으로 넣고 4시간 동안 배양한다. 배양 종료 후 well 마다 1 ml의 isoprothiolane (Sigma aldrich, MO, USA)을 넣어 보라색 결정체가 완전히 용해될 때까지 혼합한다. 그 후 570 nm 파장에서 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader로 측정한다.

2) EZ-CyTox법

마우스 비장 세포 현탁액을 200 μ l/well의 양으로 96 well plate에 넣어 배양한 후 아무런 처치를 하지 않은 군, concanavalin A (Con A (10 μ g/ml))로 자극한 군 그리고 식품 소재 추출물 (50, 100, 200 μ g/ml)을 처리한 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. 5% CO₂ 37°C 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 종료 6시간 전에 각 well에 EZ-CyTox assay reagent 10 μ l을 넣어 30분에서 6시간 동안 계속 배양하였다. 배양 종료 후 420-480 nm 파장에서 ELISA reader로 비장세포 증식능을 측정하였다.

4. 사이토카인 분비량 측정

비장세포 현탁액 중 CD4+ T isolation kit (Miltenyi biotec, CA, USA)를 이용하여 분리한 T 림프구를 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 37°C 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 등 세포활성물질은 ConA 용액에 의해 자극하며 측정은 ELISA방법으로 수행하였다. anti-mouse IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 와 anti-mouse IL-12 capture

단 클론 항체 등을 96-well plate에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 코팅하여 4°C에서 12시간 방치하였다. 코팅 후 비 특이적 결합부위를 막기 위해 2% bovine serum albumin (BSA)를 함유한 phosphate-buffered saline (PBS)에 blocking buffer를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 0.05% tween-20 을 함유한 PBS로 4회 세척 후 재조합 사람 IFN- γ , IL-2, IL-4와 재조합 생쥐 IL-12 표준액과 식품소재 (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 검체의 배양 상등액을 각 well 에 100 μl 씩 분주하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 0.05% tween-20 을 함유한 PBS로 4회 세척 후 biotinylated anti-mouse IFN- γ , IL-2, IL-4 와 anti-mouse IL-12는 1% BSA를 함유한 PBS를 이용하여 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 희석한 후 well에 처리하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 세정용 완충용액으로 7회 세척한 후 avidin-conjugated enzyme을 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 각 well에 처리한 다음 37°C에서 30분 방치한 후 7회 세척하였다. ABTS 기질액을 각 well 에 100 μl 씩 가하여 10 분간

발색을 유도한 다음 ELISA reader를 이용하여 405 nm 파장에서 IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12 등을 측정하였다.

III. 결 과

1. 단일 소재의 마우스 비장세포 증식능 측정 결과

누에를 포함한 단일 소재 11종의 마우스 비장세포 증식능을 측정된 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 누에는 102.00%의 증식능을 보였고, 두충 (128.20%), 오가피 (136.61%), 부추 (120.43%), 육계 (104.04%), 맥문동 (119.70%)은 뛰어난 증식능을 나타내었다. 반면, 당귀 (43.92%), 우슬 (54.97%), 익지 (76.26%)는 비교적 감소한 모습을 나타내었고 강황 (103.84%), 사삼 (108.21%)은 증가된 마우스 비장세포 증식능을 나타내었으나 두충, 오가피, 부추, 육계, 맥문동과 비교하여 그 효과가 미미하였다.

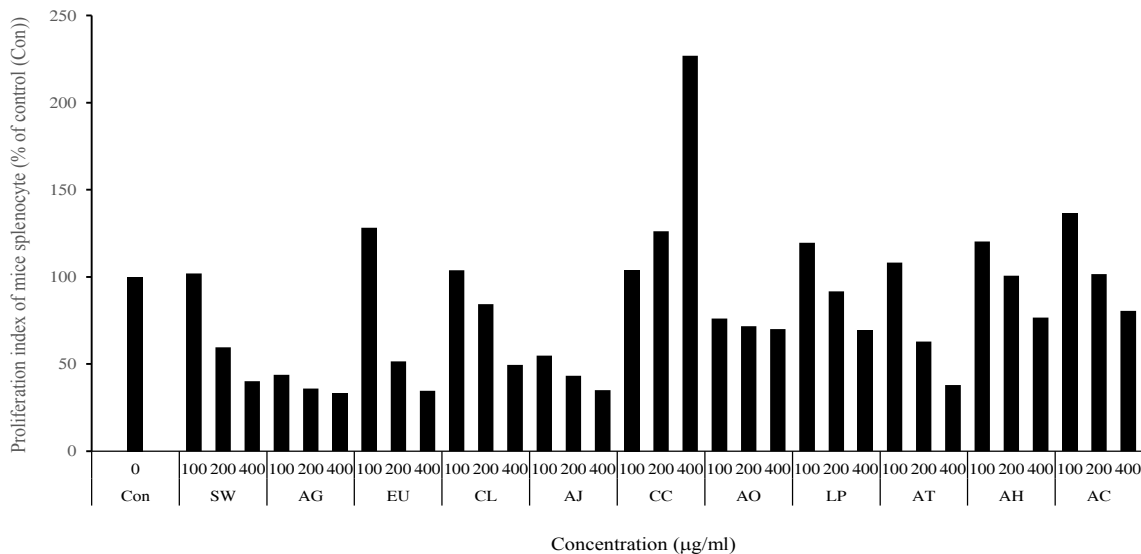


Fig 1. Proliferation index of mice splenocyte culture with food materials.

Control mice splenocyte ;Con, Silkworm ;SW, Angelica gigas ;AG, Eucommia ulmoides ;EU, Curcuma longa ;CL, Achyranthes japonica ;AJ, Cinnamomum cassia ;CC, Alpinia oxyphylla ;AO, Liriope platyphylla ;LP, Adenophora triphylla ;AT, Allium hookeri ;AH, Acanthopanax ;AC.

2. 누에 복합 추출물의 마우스 비장세포 증식능 측정 결과

단일 소재를 처리하였을 때 뛰어난 마우스 비장세포 증식능을 나타내었던 두충, 오가피, 부추, 육계, 맥문동을 누에와 혼합하여 마우스 비장세포 증식능을 측정하였다. 그 결과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 두충을 단독 처리하였을 때는 148.61 %의 마우스 비장세포 증식능을 보인 반면 누에 두충 복합 추출물은 212.93 %의 마우스 비장세포 증식능을 보여 누에와 복합 추출하였을 때 더 높은 증식능을 나타낸 것을 확인하였다. 오가피의 경우 단독 처리하였을 때 (134.87%)와 누에와 혼합하여 처리하였을 때 (135.48%) 유사한 림프구 증식능을 나타내었다.

부추 (130.57%)는 누에와 혼합하였을 때 (138.85%) 마우스 비장세포 증식능이 증가하였으나 그 차이가 거의 없었고 반면, 육계 (182.44%)는 누에와 혼합하였을 때 (222.20%) 높은 마우스 비장세포 증식능을 나타내었다. 맥문동 (153.26%) 또한

누에와 혼합하였을 때 (199.43%) 마우스 비장세포 증식능이 높아져 결과적으로 누에와 복합 추출하였을 때 정도의 차이는 있으나 대체적으로 마우스 비장세포 증식능이 증가하는 것으로 나타났고 누에와 두충, 육계, 맥문동을 복합 추출하였을 때 가장 크게 비장세포 증식능이 증가하는 것으로 나타났다.

3. 사이토카인 분비량 측정 결과

마우스 비장세포에서 분리한 T 림프구를 conA로 자극 한 뒤 누에, 두충, 오가피, 부추, 육계, 맥문동 추출물 및 누에 복합 추출물을 처리하였을 때 사이토카인 분비량을 측정하였다. IL2는 누에를 단독 처리하였을 때 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 69.85, 72.20, 72.11 pg/ml 로 나타났고 이에 비하여 누에 맥문동 복합 추출물은 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 132.56, 125.86 pg/ml 로 가장 높은 IL2 분비량을 나타

내었다. 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 누에 두충 복합 추출물 (68.91, 116.16, 116.57 pg/ml)과 누에 육계 복합 추출물

(114.18, 115.06, 88.90 pg/ml) 또한 뛰어난 사이토카인 분비량을 나타내었다.

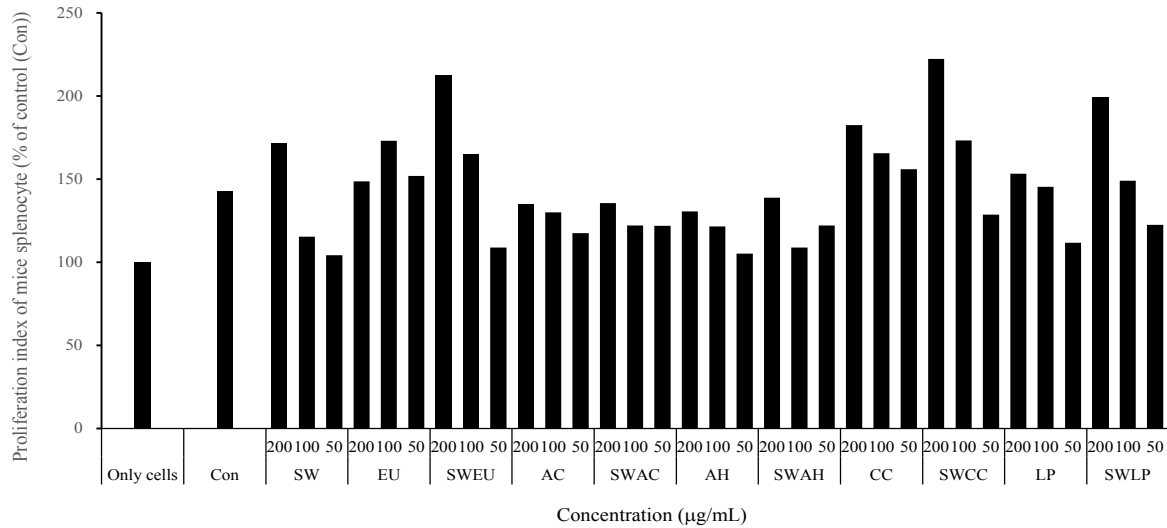


Fig 2. Proliferation index of mice splenocyte culture with combine extract of silkworm and food materials. Non treated mice splenocyte cells ;Only cells, Mice splenocyte cells stimulated with ConA ;Con, Silkworm ;SW, *Eucommia ulmoides* ;EU, combined extract of silkworm and *Eucommia ulmoides* ;SWEU, *Acanthopanax* ;AC, combined extract of silkworm and *Acanthopanax* ;SWAC, *Allium hookeri* ;AH, combined extract of silkworm and *Allium hookeri* ;SWAH, *Cinnamomum cassia* ;CC, combined extract of silkworm and *Cinnamomum cassia* ;SWCC, *Liriope platyphylla* ;LP, combined extract of silkworm and *Liriope platyphylla* ;SWLP.

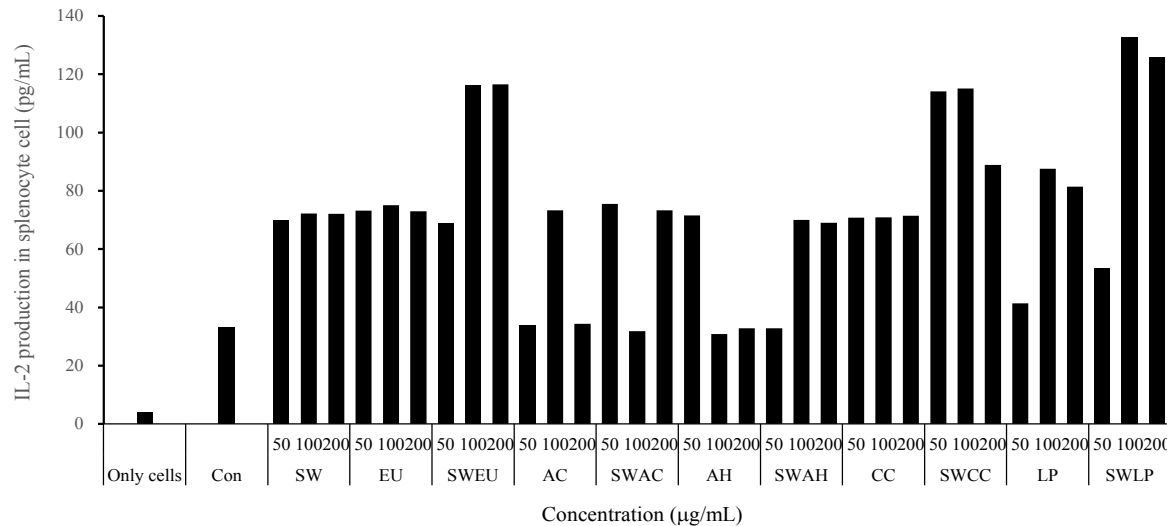


Fig 3. IL2 production by activated conA cultured with combine extract of silkworm and food materials. Non treated mice splenocyte cells ;Only cells, Mice splenocyte cells stimulated with ConA ;Con, Silkworm ;SW, *Eucommia ulmoides* ;EU, combined extract of silkworm and *Eucommia ulmoides* ;SWEU, *Acanthopanax* ;AC, combined extract of silkworm and *Acanthopanax* ;SWAC, *Allium hookeri* ;AH, combined extract of silkworm and *Allium hookeri* ;SWAH, *Cinnamomum cassia* ;CC, combined extract of silkworm and *Cinnamomum cassia* ;SWCC, *Liriope platyphylla* ;LP, combined extract of silkworm and *Liriope platyphylla* ;SWLP.

IL4는 T 림프구를 conA로 자극하였을 때 사이토카인 중 가장 낮은 분비량 (8.64 pg/ml)을 나타내었으며 이에 비하여 오가피를 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 단독 처리하였을 때 (48.02 pg/ml) 가장 뛰어난 효과를 보였고 맥문동 누에 복합추출물 (38.48 pg/ml), 육계와 누에 육계 복합추출물 (34.21 pg/ml) 또한 증가된 IL4 분비량을 나타내었다.

IL10의 경우 누에 맥문동 복합추출물이 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 152.96, 118.68, 76.66 pg/ml 로 가장 높은 증가량을 나타내었다. 또한 누에 육계 복합추출물도 200 $\mu\text{g/ml}$

농도에서 97.46 pg/ml 의 높은 IL10 분비량을 나타내었다.

IL12의 분비량은 control군 (16.10 pg/ml)에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 누에 육계 복합추출물 (33.67 pg/ml)과 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 누에 맥문동 복합추출물 (26.49 pg/ml)이 큰 증가량을 나타내었다.

IFN- γ 는 누에 육계 복합추출물이 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 46.45 pg/ml 로 가장 큰 효과를 나타내었고 누에 두충 복합추출물 (21.54 pg/ml) 및 누에 맥문동 복합추출물 (19.36 pg/ml) 또한 뛰어난 효과를 나타내었다.

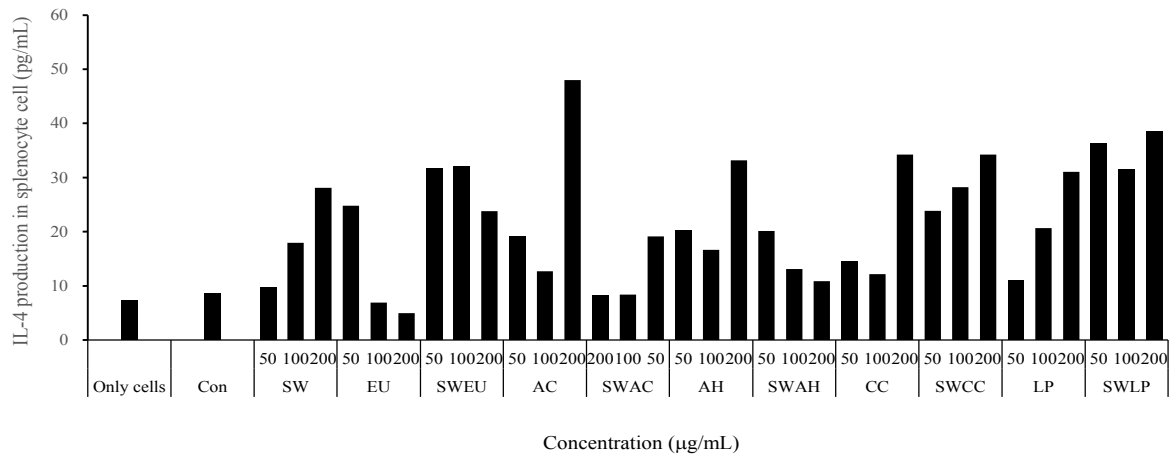


Fig 4. IL4 production by activated conA cultured with combine extract of silkworm and food materials. Non treated mice splenocyte cells ;Only cells, Mice splenocyte cells stimulated with ConA ;Con, Silkworm ;SW, *Eucommia ulmoides* ;EU, combined extract of silkworm and *Eucommia ulmoides* ;SWEU, *Acanthopanax* ;AC, combined extract of silkworm and *Acanthopanax* ;SWAC, *Allium hookeri* ;AH, combined extract of silkworm and *Allium hookeri* ;SWAH, *Cinnamomum cassia* ;CC, combined extract of silkworm and *Cinnamomum cassia* ;SWCC, *Liriope platyphylla* ;LP, combined extract of silkworm and *Liriope platyphylla* ;SWLP.

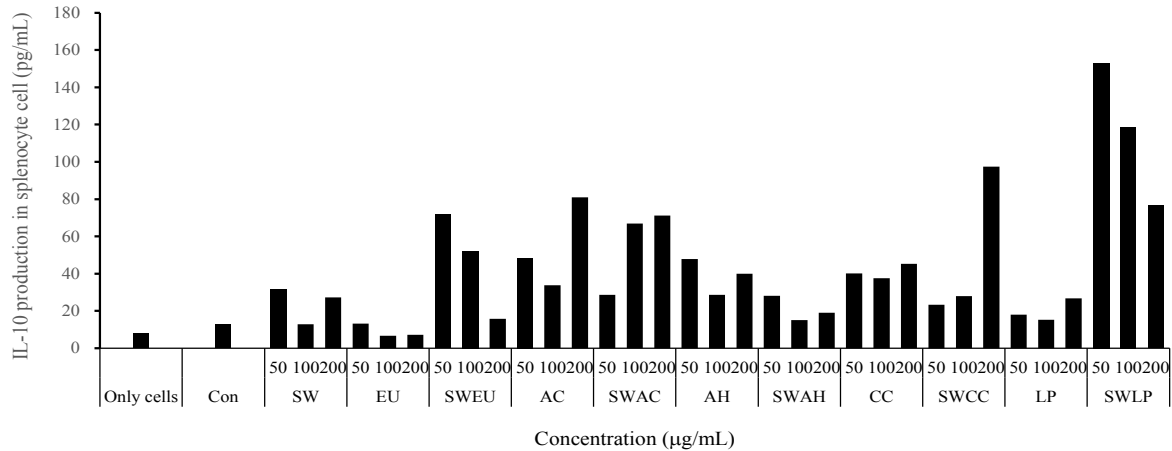


Fig 5. IL10 production by activated conA cultured with combine extract of silkworm and food materials. Non treated mice splenocyte cells ;Only cells, Mice splenocyte cells stimulated with ConA ;Con, Silkworm ;SW, *Eucommia ulmoides* ;EU, combined extract of silkworm and *Eucommia ulmoides* ;SWEU, *Acanthopanax* ;AC, combined extract of silkworm and *Acanthopanax* ;SWAC, *Allium hookeri* ;AH, combined extract of silkworm and *Allium hookeri* ;SWAH, *Cinnamomum cassia* ;CC, combined extract of silkworm and *Cinnamomum cassia* ;SWCC, *Liriope platyphylla* ;LP, combined extract of silkworm and *Liriope platyphylla* ;SWLP.

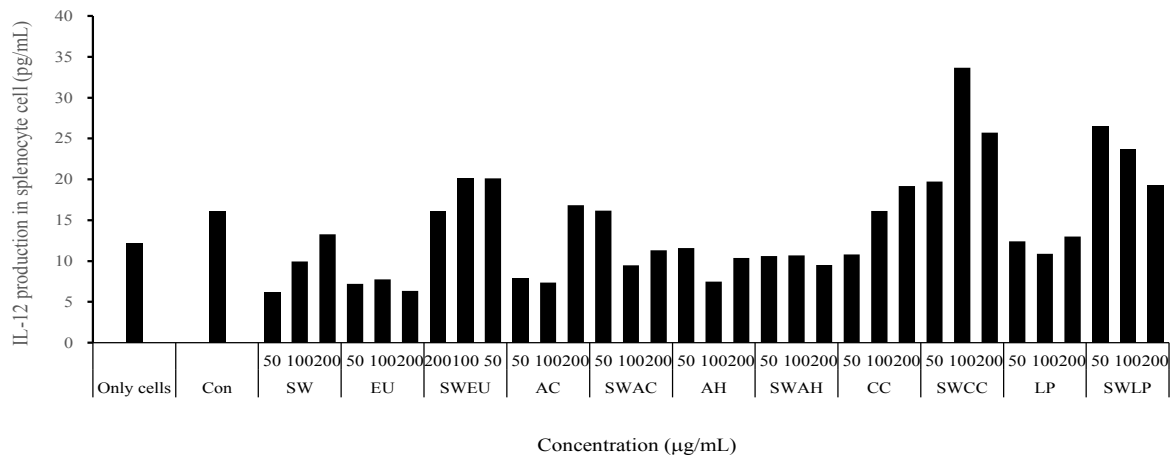


Fig 6. IL12 production by activated conA cultured with combine extract of silkworm and food materials. Non treated mice splenocyte cells ;Only cells, Mice splenocyte cells stimulated with ConA ;Con, Silkworm ;SW, *Eucommia ulmoides* ;EU, combined extract of silkworm and *Eucommia ulmoides* ;SWEU, *Acanthopanax* ;AC, combined extract of silkworm and *Acanthopanax* ;SWAC, *Allium hookeri* ;AH, combined extract of silkworm and *Allium hookeri* ;SWAH, *Cinnamomum cassia* ;CC, combined extract of silkworm and *Cinnamomum cassia* ;SWCC, *Liriope platyphylla* ;LP, combined extract of silkworm and *Liriope platyphylla* ;SWLP.

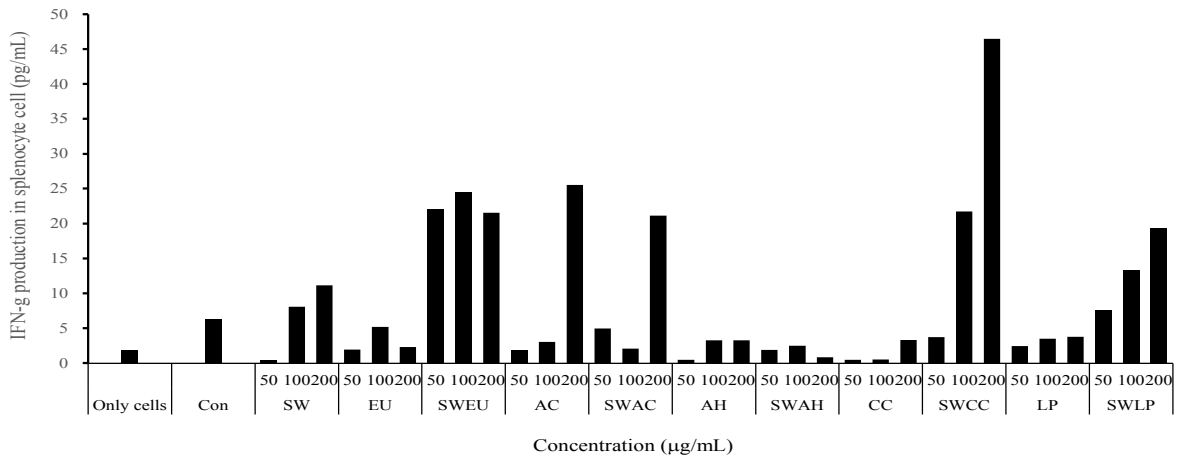


Fig 7. IFN- γ production by activated conA cultured with combine extract of silkworm and food materials.

Non treated mice splenocyte cells; Only cells, Mice splenocyte cells stimulated with ConA ;Con, Silkworm ;SW, *Eucommia ulmoides* ;EU, combined extract of silkworm and *Eucommia ulmoides* ;SWEU, *Acanthopanax* ;AC, combined extract of silkworm and *Acanthopanax* ;SWAC, *Allium hookeri* ;AH, combined extract of silkworm and *Allium hookeri* ;SWAH, *Cinnamomum cassia* ;CC, combined extract of silkworm and *Cinnamomum cassia* ;SWCC, *Liriope platyphylla* ;LP, combined extract of silkworm and *Liriope platyphylla* ;SWLP.

IV. 고 찰

면역은 체내에 항원 감염 시 이를 인지하고 반응을 통하여 감염 물질을 제거하는 역할을 하는데, 면역계의 기능이 떨어지게 되면 감염성 질환이 발생할 뿐만 아니라 암 억제 기능도 떨어지게 되고 반대로 면역 기능이 항진되면 알러지, 류마티스성 관절염, 루푸스, 건선 등과 같은 자가면역질환의 원인이 된다. 따라서 면역반응은 항상성을 유지하는 것이 중요하다¹⁷⁾.

본 연구에서는 면역 활성 증진 효과가 뛰어나다고 보고된 10종의 식품 소재 (두충 (*Eucommia ulmoides*), 당귀 (*Angelica gigas*), 오가피 (*Acanthopanax*), 부추 (*Allium hooker*), 육계 (*Cinnamomum cassia*), 맥문동 (*Liriope platyphylla*), 강황 (*Curcuma longa*), 우슬 (*Achyranthes japonica*), 익지 (*Alpinia oxyphylla*), 사삼 (*Adenophora triphylla*))의 마우스 비장세포 증식능을 평가하였고 이중 비장세포 증식능이 높은 식품 소재 5종을 선정했다. 5종의 식품소재를 누에와 복합 추출하여 EZ-CyTox법을 사용하여 마우스 비장세포 증식능을 평가하였고 누에 복합 추출물의 IL2, IL4, IL10, IL12, IFN- γ 와 같은 사이토카인 생성량을 평가하여 면역 기능 증진 효과를 비교 연구하였다.

8주령 수컷 마우스를 경주 탈골하여 비장을 적출한 다음 비장세포를 배양하여 실험에 사용하였다. 비장은 T 세포, B 세포, 대식세포 등의 여러 가지 림프구가 밀집되어있는 장기로서 생체 내 면역기능을 담당하는 면역기관이다¹⁸⁾. 누에를 포함한 단일 소재 11종을 마우스 비장세포에 처리한 다음 72 시간동안 배양하여 비장세포 증식능을 측정된 결과, 두충 (128.20%), 오가피 (136.61%), 부추 (120.43%), 육계 (104.04%), 맥문동 (119.70%)이 뛰어난 증식능을 나타내었다.

단일 소재를 처리하였을 때 마우스 비장세포 증식능 실험 결과를 토대로 선정된 두충, 오가피, 부추, 육계, 맥문동을 누에와 혼합하여 마우스 비장세포에 처리한 다음 증식능을 계산하였다. 실험 결과, 누에를 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 단독으로 비장세포에 처리하였을 때 (171.87 %) 보다 누에와 두충 (212.93 %), 육계 (182.44 %)를 복합 추출하였을 때 비장세포

증식능이 증가하는 것으로 나타났다.

마우스 비장세포에서 T 림프구를 분리하여 누에, 두충, 오가피, 부추, 육계, 맥문동 추출물 및 누에 복합 추출물과 함께 배양한 후 conA 용액으로 자극하여 분리된 사이토카인의 양을 비교 분석하였다.

T 세포는 크게 세포독성 T 세포 (cytotoxic T cell, Tc cells)와 보조 T 세포 (helper T cell, Th cells)로 나누어지며, Th세포는 분비되는 사이토카인에 의해 다시 Th1과 Th2로 나누어 진다. Th1은 IL2, IFN- γ , TNF- α 를 분비하고 세포성 면역반응을 매개한다. Th2는 IL4, IL10 등을 생성하고 체액성 면역반응을 매개한다¹⁹⁾.

IL2는 IFN- γ 등과 함께 전구염증성 사이토카인으로 분류되어 면역작용의 지표로 알려져 있다. 체내 염증이 발생하였을 때 초기에 분비되는 반응물질로서 조직 손상이 커지는 것을 막아주는 역할을 한다²⁰⁾. IL2는 누에를 단독 처리하였을 때 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 72.11 pg/mL로 나타났고 누에 맥문동 복합 추출물은 같은 농도에서 약 1.7배 증가하여 125.86 pg/mL의 가장 높은 IL2 분비량을 나타내었다.

IL4는 전형적인 Th2 형 사이토카인으로서 대식세포의 기능을 활성화 시키는 역할을 한다²¹⁾. 본 실험에서는 사이토카인 중 가장 낮은 분비량 (8.64 pg/mL)을 나타내었으며 이에 비하여 오가피를 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 단독 처리하였을 때 (48.02 pg/mL) 대조군에 비해 약 5.5배 증가하여 가장 뛰어난 효과를 보였고 맥문동 누에 복합추출물 (38.48 pg/mL), 육계와 누에 육계 복합추출물 (34.21 pg/mL)는 동일하게 증가된 IL4 분비량을 나타내었다.

IL10의 경우 누에 맥문동 복합추출물이 가장 높은 증가량을 나타내었고 누에 육계 복합추출물도 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 97.46 pg/mL의 높은 IL10 분비량을 나타내었다.

사이토카인은 면역반응력을 결정하는 중요한 역할을 수행하는데 균이 체내에 침입할 경우 대식세포는 IL12의 생성을 유도하고 IL12는 IFN- γ 의 생성을 자극하는 역할을 한다²²⁾. 본 실험에서 IL12의 분비량은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 누에 육계 복합추출물 (33.67 pg/mL)과 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 누에 맥문동

복합추출물 (26.49 pg/ml)이 가장 크게 증가하였다.

IFN- γ 는 IL12에 의해 전사가 증진되며 단핵식균세포의 활성, 대식세포의 활성, T림프구 분화의 증진 등 많은 면역기능을 가지고 있다²³⁾. IFN- γ 분비량을 측정된 결과 IL12 사이토카인 분비량 결과와 일치하게 누에 육계 복합추출물이 가장 큰 증가량을 나타내었고 누에 두충 복합추출물 및 누에 맥문동 복합 추출물 또한 높은 증가량을 나타내었다.

결과적으로 누에 및 10종의 단일 식품 소재 추출물을 단독으로 사용하였을 때 보다 누에와 식품소재를 함께 추출하였을 때 높은 비장세포 증식능을 나타내었으며, 특히 누에 맥문동 복합 추출물과 누에 육계 복합 추출물은 뛰어난 사이토카인 분비량을 나타내어 면역 활성 증진효과가 있다고 판단된다.

V. 결 론

누에 복합 추출물의 면역 활성 증진 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 누에를 포함한 단일 한약재 10종의 마우스 비장세포의 림프구 증식능을 측정된 결과, 두충, 오가피, 부추, 육계, 맥문동에서 큰 증가량을 나타내었다.
2. 두충, 오가피, 부추, 육계 맥문동을 누에와 복합 추출하여 마우스 비장세포의 림프구 증식능을 측정된 결과, 정도의 차이는 있으나 단일 소재로 사용하였을 때 보다 복합 추출하였을 때 림프구 증식능이 증가하는 것으로 나타났으며 누에 두충 복합추출물, 누에 육계 복합추출물, 누에 맥문동 복합추출물은 비교적 높은 증가량을 나타내었다.
3. 사이토카인 증가량을 측정하였을 때, 단일 소재 처리군 보다 누에 복합 추출물 처리군에서 IL2, IL4, IL10, IL12, IFN- γ 가 증가하였고 특히 IL2, IL4, IL10의 경우 누에 맥문동 복합 추출물이, IL12, IFN- γ 에서는 누에 육계 복합 추출물이 뛰어난 효과를 나타내었다.

이상의 결과들로 누에 및 식품소재를 단일소재로 사용하였을 때 보다 누에 복합 추출물은 비교적 높은 면역 활성 증진 효과를 가지고 있고 특히 누에 맥문동 추출물 및 육계 누에 복합 추출물은 사이토카인을 증가시켜 면역력 감소를 예방하는 기능성 식품 소재로 활용될 가능성이 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구결과는 2016년도 산업통상자원부에서 시행한 지역주력산업 공통기반기술활용지원사업 (과제번호 : R0005510)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Yoon JW, Rhee SK, Lee KB. Effects of silkworm extract powder on plasma lipids and glucose in rats. *Korean J. Food & Nutr.* 2005 ; 18(2) : 140-5.
2. Kwon YJ, Kim HJ. Quality characteristics of white pan bread containing heat treated silkworm steam extract. *Food Service Industry Journal.* 2016 ; 12(1) : 87-97.
3. Ryu KS, Lee HS, Kim SY. Pharmacodynamic study of silkworm powder in mice administered to maltose, sucrose and lactose. *Korean J. Seric. Sci.* 1999 ; 41(1) : 9-13.
4. Chon JW, Kweon HY, Jo YY, Park MK, Son YH, Lee HS. A study on the development of functional cosmetics using silk-gland powder of silkworm. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* 2012 ; 38(2) : 163-9.
5. Cha JY, Kim YS, Kang PD, Ahn HY, Eom KE, Cho YS. Biological activity and chemical characteristics of fermented silkworm powder by mold. *Journal of Life Science.* 2010 ; 20(2) : 237-44.
6. Kim SH, Je YH, Yun EY, Kang SW, Kim KY, Kang SK. Isolation and characterization of inducible genes from *Bombyx mori* injected with *E.coli* by differential screening. *Korean J. Seric. Sci.* 1996 ; 38(1) : 19-24.
7. Hyun JW, Lee KG, Yeo JH, Choe TB. Hair care effects of hair cosmetics including low molecular weight silk peptide component and micro structure analysis. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 2008 ; 23(5) : 439-44.
8. Yoo JM, Hwang JS, Goo TW, Yun EY. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2013 ; 42(2) : 249-54.
9. Ryu HS, Kim J, Kim HS. Enhancing effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (*Sorghum, su-su*) Extracts on mouse spleen and macrophage cell activation. *Korean J. Food & Nutr.* 2006 ; 19(2) : 176-82.
10. Han SB, Kim YH, Lee CW, Park SM, Lee HY, Ahn KS, Kim IH, Kim HM. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacology.* 1998 ; 40(1) : 39-48.
11. Park HR, Yu YB, Yee ST, Jo SK. Enhancement of immune response by water extract of *Angelica gigas* Nakai. *J. Life Resources & Industry.* 1998 ; 3 : 80-8.
12. Kim HW, Kim KY, Lee SY, Kim GY, Jeon BG, Cho SI, Jeong HW. Immuno-stimulating effects of Oga-Power (OP) containing extract of *Acanthopanax sessiliflorus* on Immune cells in mice. *Kor. J. Herbology.* 2008 ; 23(3) : 141-7.
13. Park SD, Lee GH, Lee YS, Kwon YK, Park JH, Chou SM, Shin SW. Comparison of immunomodulatory effects of water-extracted *Adenophorae Radix*, *Liriopis Tuber*, *Dendrobii Herba*, *Polygonati Odorati Rhizoma*

- and Polygonati Rhizoma. Korean J. Oriental & Pathology. 2007 ; 21(2) : 414-24.
14. Lee SH, Sung GD, Baek YH. The effects of 10 weeks Taekwondo training with leek intake on body composition, liver enzymes and immune function in high school male students. J. Korean Soc. Living Environ. Sys. 2013 ; 20(1) : 19-28.
 15. Gereltuya R, Son JY, Magsar U, Paik SH, Lee JY, Nam MS. Fermentation properties and inflammatory cytokines modulating of fermented milk with Curcuma longa L powder. Journal of Life Science. 2015 ; 25(1) : 75-83.
 16. Lee SD, Kim KS. The effect of Achyranthis Radix and Apitoxin Aquaacupuncture on cellular immune responses to LPS-induced arthritis in mice. The Acupuncture. 1999 ; 16(3) : 287-315.
 17. Na CS, Shin W, Lee YM, Moon YS, Noh HK, Seo SH, Son HS. Effect of original kyungokgo & iksuyongjingo plus Sparassis crispa on antioxidant, immunity improvement and sensory evaluation. Kor. J. Herbol. 2016 ; 31(4) : 43-51.
 18. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology 2nd ed., Churchill Livingstone, London, 1,3-3. 10. 1989.
 19. Oh JS, Ham IH, Kim HM, Choi HY. Enhancement of immune activities of Cistanche deserticolae Herba and Cistanche salsae Herba. Kor. J. Herbol. 2005 ; 20(1) : 63-72.
 20. Kim MH, Kim JH, Ahn HJ. Responses of proinflammatory and anti-Inflammatory cytokines with clonidine premedication in patients undergoing spinal surgery. Korean J Anesthesiology. 1998 ; 35 : 1080-8.
 21. Park DJ, Lee JC, Lee YC. Effect of Sinapis alba L. on expression of interferon-gamma and interleukin-4 production in anti-CD3/anti-CD28-stimulated CD4(+) T cells. Kor. J. Herbol. 2010 ; 25(2) : 129-36.
 22. Raishekhar SA, Ashok Khar. Interleukin-12 secreted by mature dendritic cells mediates activation of NK cell function. FEBS letters, 2004 ; 559(1-3) : 71-76.
 23. Park JH, Seo YB. Experimental studies on the immunomodulatory effects of Taxilli Ramulus. Kor. J. Herbol. 2001 ; 16(1) : 55-71.