

자소엽(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo) 조다당류 추출물의 면역활성 효과

변 의 홍*
공주대학교 식품공학과

Immunomodulatory activities of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo

Eui-Hong Byun*

Department of Food Science and Technology, Kongju National University

Abstract This aim of this study was to examine the immunomodulatory activities of crude polysaccharides from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (PCP) in mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and splenocytes. The immunomodulatory activity was determined by cell viability, nitric oxide (NO) production, cell surface marker expression (CD 80/86 and MHC class I/II), and cytokine production in BMDC, and cell viability, and cytokine production in splenocytes. Cell proliferation and cytokine production (tumor necrosis factor; TNF- α , interleukin (IL)-6, IL-1 β , and IL-12) tested in BMDC were significantly increased by PCP treatment. Additionally, the cell surface markers (CD 80/86, MHC class I/II) were highly increased by PCP treatment. For cytokine production in splenocytes, PCP treatment significantly increased the production of Th 1 cytokines [IL-2 and interferon (IFN)- γ], but not Th 2 cytokines (IL-4). Therefore, PCP can induce immune cell activation and is a potential candidate for the development of nutraceuticals to boost the immune system.

Keywords: *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo, crude polysaccharide, dendritic cells, splenocyte, immunomodulatory activity, cytokine production

서 론

최근 자연물에서 분리한 다당류 및 단백질 등과 같은 고분자 물질의 생체 내 면역 활성화에 대한 연구가 다양하게 보고되고 있으며, 이들은 합성 의약품과 견주어 볼 때 비교적 낮은 독성을 나타내는 장점이 있다(1). 이러한 자연물에서 분리된 다당류는 큰 포식세포 및 수지상세포, 림프구, 자연 살해세포 등을 활성화시켜 면역조절활성을 증진시킨다고 널리 보고되어져 왔다(2).

인체의 면역계는 매우 복잡하고 다양한 면역세포들간의 상호 작용에 의하여 그 체계가 유지된다고 알려져 있으며, 외부 병원성 항원이 생체내로 침입하였을 때 1차적으로 반응하는 선천 면역세포로는 단핵구(monocyte), 호중구(neutrophile) 및 포식세포(phagocyte) 등이 있다(3). 이들 중 수지상세포 및 대식세포는 대표적인 선천면역세포로서 외부 항원을 포식하고, 면역조절인자인 산화질소(nitric oxide; NO)와 proinflammatory 사이토카인(cytokine)을 분비하여 선천면역의 활성을 유도할 뿐만 아니라, 외부 항원을 인식하여 2차적으로 반응하는 면역 T세포에 전달하여 적응면

역시스템의 활성화에도 크게 기여하는 것으로 보고되고 있다(4). 포식세포들은 면역조절물질인 사이토카인들을 분비함으로써 면역 반응을 매개한다. 즉, 포식세포로부터 분비된 다양한 사이토카인류들은 자기 자신을 활성화 시켜 포식작용을 증가시키거나, 또는 자연살해세포 등의 선천면역을 매개하는 세포뿐 아니라, 후천성 면역을 담당하는 T림프구를 활성화 하거나 분화를 조절한다고 알려져 있다(2). 후천성 면역반응은 주로 T 세포 및 B 세포에 의하여 이루어지고 선천성 면역반응 후에 포식세포에 의하여 제시 되는 특이 항원을 인식하면서 면역반응이 개시되며, 면역반응의 강도가 선천면역에 비하여 매우 큰 특징을 가지고 있다(2).

자소엽(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 일년생 식물로서 전체가 자색을 띠고 있으며, 꽃은 8-9월에 피며, 잎은 엽병이 길고 잎 끝이 췌기모양이며 끝이 날카로운 특징을 가지고 있다. 전통적으로는 감기, 산욕열, 황달, 각종 신경성 열병 등에 사용되며 지혈약으로도 사용되어 왔으며(5), 최근 자소엽에 함유되어있는 테페노이드(terpenoids), 페놀화합물(phenolic compound) 등이 항염증 및 항알레르기 작용, 항균작용, 산화방지작용 등의 약리작용이 뛰어나다고 보고되고 있다(6-13). 그러나 자소엽에서 분리된 다당류의 생리활성에 관한 연구는 아직까지 전무한 실정이다.

본 연구는 자소엽에서 분리된 다당류의 면역활성능에 관하여 알아보기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 수지상세포 및 비장세포에 자소엽 다당류를 처리하여 세포생존율, 면역조절 물질인 산화질소, proinflammatory 사이토카인의 분비능, 세포표면 활성화인자(CD80/86, MHC class I/II)들의 발현 등에 미치는 영향

*Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan, Chungnam 32439, Korea
Tel: +82-41-330-1481
Fax: +82-41-330-1489
E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr
Received May 30, 2017; revised July 14, 2017;
accepted July 21, 2017

에 관하여 알아보았다.

재료 및 방법

자소엽 조다당의 분리

본 실험에 사용된 자소엽(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo)은 2016년 8월 충남 예산지역에서 채취하였고, 실험을 위해서 7일 동안 음건하여 수분을 완전히 제거하고, 밀봉하여 실온에서 보관하며 실험에 사용하였다. 건조된 자소엽을 실험용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여, 건조분말 100 g에 900 mL의 distilled water (DW)를 가하여 100°C에서 2시간 동안 열수추출 하였다. 추출물을 거름종이(filter paper, No. 4, Whatman, Kent, UK)로 여과 후, 여과액에 70% 에탄올을 가하여 4°C에서 12시간 동안 방치한 후, 3200 rpm으로 30분 동안 원심분리(Combi 514R, Hanil, Seoul, Korea)하여 침지된 조다당(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo crude polysaccharide; PCP)을 분리하고, 이를 냉동 건조하여 자소엽 조다당으로 실험에 사용하였다.

실험동물

실험동물은 6주령(18-20 g)의 C57BL/6 웅성 마우스를 Orient (Seongnam, Korea)사로부터 구입하여 사용하였다. 분양받은 마우스는 동물사육실 내부 환경에 1주간 순화시킨 후 미분화 골수세포 및 비장세포를 채취하기 위하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 실험동물은 한국원자력연구원 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(KAERI-IACUC-2016-008).

골수세포로부터 수지상세포로의 분화 유도

C57BL/6 마우스로부터 골수 채취용 주사기(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용해 대퇴부 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 차가운 인산완충용액(phosphate buffered saline; PBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)으로 3회 세척한 후 적혈구를 제거하기 위하여 적혈구(red blood cell; RBC) lysis buffer (Invitrogen Co.)를 5 mL 처리하여 10분간 방치하였다. 인산완충용액으로 3번 세척하여 적혈구 찌꺼기를 완전히 제거하였다. 분리한 미분화 골수세포를 수지상세포로 분화시키기 위하여 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 포함되어 있는 Roswell park memorial institute (RPMI) 1640 배지(Invitrogen Co.)에 2 mM L-glutamin, 100 unit/mL 페니실린(penicillin)/스트렙토마이신(streptomycin), 50 μ M 머캅토에탄올(mercaptoethanol), 0.1 mM 비필수아미노산(non-essential amino acid), 1 mM sodium pyruvate, 20 ng/mL granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF, R&D System, Minneapolis, MN, USA), 20 ng/mL IL-4 (R&D System)를 첨가하여 8일 동안 배양하였다.

골수 분화 유도 수지상 세포의 세포 생존율 평가

골수 분화 수지상 세포를 96 well plate에 3×10^4 cell/well의 농도로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고 PCP를 인산완충용액(WelGene, Daegu, Korea)에 용해하여 1, 5, 및 10 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 또한, 음성대조구로는 샘플 대신에 동량의 인산완충용액을 처리하였고, 양성대조구로는 지방질다당류(lipopolysaccharide; LPS)를 200 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후 well 당 30 μ L의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT; Sigma-Aldrich, Co., St. Louis,

MO, USA) 용액(1 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT시약의 첨가로 형성된 포마잔(formazan)을 녹이기 위해서 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO, Sigma-Aldrich, Co.)를 100 μ L씩 첨가하고 1시간 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구(control, medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

사이토카인 분비 유도능 평가

48 well plate에 골수 분화 수지상 세포를 5×10^4 cell/well로 분주한 후, PCP를 1, 5, 및 10 μ g/mL의 농도로 처리하였고, 양성대조구인 지방질다당류를 200 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후, 분리된 배양 상층액에서 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)의 함량을 측정하였다. 사이토카인의 함량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정 하였으며, 이때 사이토카인의 농도는 kit에 포함되어 있는 표준 용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

산화질소(NO)(Nitric oxide) 유도능 평가

분리된 배양 상층액 100 μ L에 동량의 Griess (Sigma-Aldrich, Co.) 시약을 처리하여 10분 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화질소의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂, Sigma-Aldrich, Co.)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

수지상세포의 세포 표면 활성 인자(cell surface marker)에 미치는 영향

수지상세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 수지상세포를 각각 6 well plate에 well당 1×10^6 개로 분주한 후, PCP를 1, 5, 및 10 μ g/mL의 농도로 처리하였고, 양성대조구인 지방질다당류를 200 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후 다양한 농도로 PCP를 처리한 각각의 세포를 회수하였다. 항체의 비 특이적인 결합을 방지하기 위하여 회수된 각각의 세포에 1 μ g/mL의 Fcy I/III (BD Biosciences)을 처리하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE, anti-MHC I 및 II-PE (BD Biosciences)의 항체를 각각 1,000배 희석하여 세포에 처리하여 30분 동안 반응시키고, 유세포 분석기(FACS callibur, BD Biosciences)를 이용하여 수지상세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향에 관하여 분석하였다.

비장세포 분리

1주간의 순화를 마친 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 비장을 무균적으로 적출하여 10%의 소태아혈청과 항생제 페니실린과 스트렙토마이신(100 unit/mL, 100 μ g/mL)을 함유한 RPMI-1640 배지로 3회 세척한 후 조직균질기(tissue grinder, Coming Costar, Coming, NY, USA)로 균질화하여 비장세포를 유리시켰다. 세포현탁액에 적혈구를 제거하기 위하여 적혈구 lysis buffer (BD Biosciences)를 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 혈구계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다.

비장세포의 세포 증식능 평가

96 well plate에 well당 1×10^6 개의 비장세포를 분주한 후, PCP 1, 5, 및 10 μ g/mL과 양성 대조구인 ConA를 1 μ g/mL의 농도로 처리하였고, 37°C로 유지되는 5% CO₂ 세포 배양기에서 24시간

배양한 후, WST-1® (Daeil Lap Science, Seoul, Korea) 용액을 각각의 well에 10 µL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포증식능을 평가하였다. 비장세포의 증식능은 다음 식에 의하여 계산되었다.

$$\text{Splenocyte proliferation (\%)} = \frac{\text{Sample 처리구의 흡광도}}{\text{Sample 무처리구의 흡광도}} \times 100$$

비장세포의 대한 사이토카인 분비능 평가

비장 조직으로부터 분리된 비장세포를 48 well plate에 well당 2×10⁶개씩 분주한 후 PCP를 1, 5, 및 10 µg/mL의 농도로 처리하였고, 또한 양성 대조구인 ConA를 1 µg/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양 상등액에 존재하는 사이토카인(IL-2, 4, 및 IFN-γ)의 함량에 관하여 측정하였다. 사이토카인의 함량측정은 ELISA kit (eBioscience)를 사용하여 측정하였다.

통계 분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical package for social sciences (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

PCP 처리에 따른 수지상세포의 생존율 평가

PCP의 처리가 수지상세포의 세포독성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 미분화 골수세포로부터 분화된 수지상세포에 PCP를 처리하여 세포생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). 음성대조구로는 PCP 대신 동량의 인산완충용액을 처리하였고, 양성 대조구로는 수지상세포의 유사분열촉진제(mitogen)인 지방질 다당류를 0.2 µg/mL로 처리하여 세포생존율에 미치는 영향에 관하여 비교하였다. PCP를 수지상세포에 1, 5 및 10 µg/mL의 농도로 처리(n=3)하였을 때, 세포 생존율이 각각 103.4±3.8, 108.8±2.1, 117.8±3.3%로 관찰되었으며, 이는 음성대조구(CON)와 비교하였을 때 PCP 처리농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용된 지방질다당류는 대식세포 및 수지상세포의 유사분열 촉진제로, 지방질다당류 처리 시 면역을 매개하는 다양한 면역관련 인자의 분비를 증가 시켜, 미지의 시료에 대한 면역활성능 평가 시 양성대조구로서 면역활성의 정도를 비교하는데 주로 사용된다(14). 천연물에서 분리된 다당류들은 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있으며, 특히 면역세포를 자극하여 면역세포의 증식능을 증가시키거나, 사이토카인의 분비를 활성화시켜 면역반응을 활발하게 유지시키고, 항보체활성, 암세포를 직접적으로 죽일 수 있는 면역세포의 활성화에도 크게 작용하는 보고되어지고 있다(15,16). 따라서 본 연구에서도 자소엽으로부터 분리된 다당류인 PCP의 처리는 수지상세포의 세포독성에 영향을 미치지 않았으며, 추후 PCP 처리에 따른 면역활성을 평가하기 위하여 수지상세포의 사이토카인 및 산화질소(NO)의 분비능에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다.

PCP 처리가 수지상세포의 산화질소(NO) 분비능에 미치는 영향

외래 항원의 침입에 의해 활성화된 포식세포는 항원을 포식하고, 항원에 대한 정보를 후천면역반응에 전달하여, 세포매개성 면역반응의 활성을 유도한다. 활성화된 수지상세포가 분비하는 산화질소는 생체 내에서 L-arginin으로부터 iNOS에 의해 생성되며,

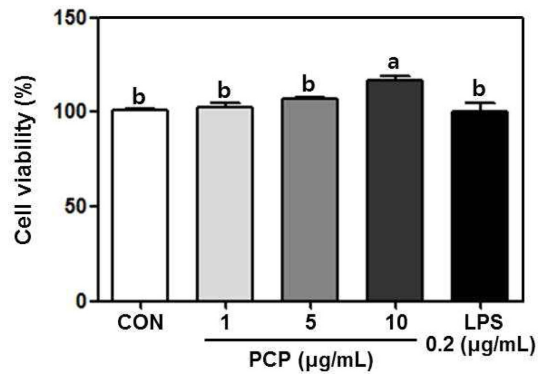


Fig. 1. Cell viability test of crude polysaccharide from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (PCP) in bone-marrow derived dendritic cell. PCP was treated at the concentration of 1, 5, and 10 µg/mL, and lipopolysaccharide (LPS) was treated at the concentration of 0.2 µg/mL as a positive control. Cell viability was conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and ^{ab}values with different letters were significantly different (p<0.05).

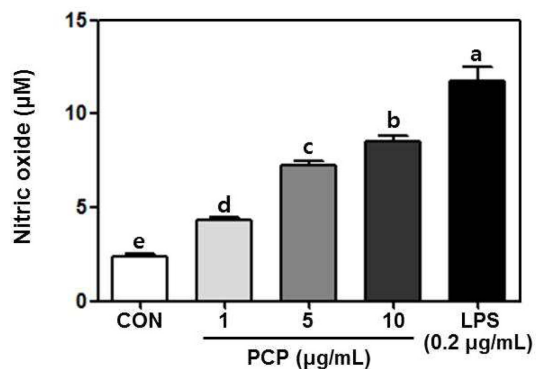


Fig. 2. Nitric oxide (NO) production activity of crude polysaccharide from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (PCP) in bone-marrow derived dendritic cell. PCP was treated at the concentration of 1, 5, and 10 µg/mL. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2 µg/mL. After 24 h, NO production in culture supernatant was analyzed by Griess reagent assay. The results are expressed as mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and ^{abcde}values with different letters were significantly different (p<0.05).

생체 내 감염을 일으키는 항원을 효과적으로 제어하기 위한 수단으로 사용된다(17). 따라서 산화질소의 분비능은 수지상세포의 활성화에 관한 중요한 바이오마커(bio-marker)로 인식된다(18).

본 연구에서 PCP의 처리가 수지상세포의 활성화에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여, 수지상세포에 PCP를 처리한 후 세포 상등액에서 산화질소 분비능에 관하여 알아보았다(Fig. 2). 양성 대조구인 지방질다당류를 처리하여 산화질소 분비능을 관찰한 결과, 지방질다당류의 처리에 따라 산화질소 분비능이 11.2±0.8 µM (n=3)로 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

또한 상기 세포생존율 평가에서 수지상세포의 세포독성에 영향을 미치지 않는 농도인 1, 5, 및 10 µg/mL로 PCP를 처리하여 산화질소의 분비능을 관찰한 결과, 각각 4.5±0.2, 7.3±0.3, 8.7±0.4 µM (n=3)로 PCP 처리농도 의존적으로 산화질소의 분비능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 산화질소는 라디칼 물질로서 세

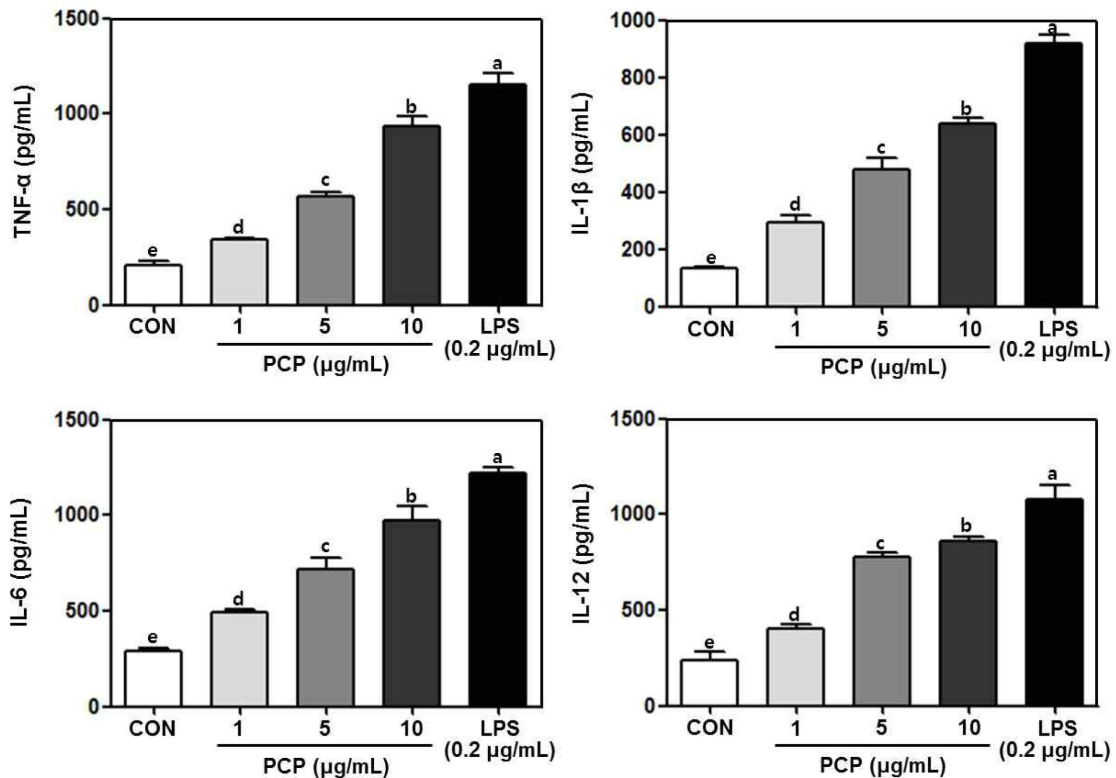


Fig. 3. Cytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β , and IL-12) productions activity of crude polysaccharide from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (PCP) in bone-marrow derived dendritic cell. PCP was treated at the concentration of 1, 5, and 10 $\mu\text{g/mL}$. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2 $\mu\text{g/mL}$. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. The results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and ^{abcde} values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

포 내에서 면역신호 전달자로서 중요한 역할을 수행한다(19). 탐식세포로부터 분비되는 산화질소는 암세포에 대한 독성을 나타내며, 사이토카인의 분비를 촉진시켜 면역 반응을 증강시킨다고 보고되고 있으며(20-22), 본 연구에서도 수지상세포에 PCP를 처리하면 산화질소의 생성이 증가되는 것으로 관찰되어 자소엽 다당류 추출물(PCP)은 수지상세포의 산화질소 분비능을 증가시켜 면역활성에 기여하는 것으로 판단된다.

PCP 처리가 수지상세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향

수지상세포와 같은 포식세포들이 외부 자극에 의해 활성화되면 부착성이 강해지며, 외부 바이러스나 세균에 오염된 세포를 직접적으로 탐식하여 사멸시키거나 간접적으로 면역력을 활성화시키는 사이토카인이라는 물질을 생산한다(23). 사이토카인은 면역세포 간의 상호협력을 중재하는 역할을 수행하며, 기타 외부에서 오는 다양한 자극에 대하여 한 개체의 세포와 조직들이 유기적으로 작용하도록 도와줄 뿐만 아니라 조절작용, 면역반응, 일반적인 염증과정 등을 조절하는 것으로 보고된다(24). 수지상세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등이 있으며, 이들은 수지상세포의 활성화 지표로서 다양한 물질의 면역활성을 판단하는 척도로 여겨진다(24). 종양괴사인자로서 잘 알려져 있는 TNF- α 는 수지상세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로써, 외부 유입 병원체 및 미생물과 같은 항원에 오염된 세포의 살해능력을 증가시켜, 숙주의 감염부위를 국소화시켜 초기 면역반응에서 중요한 역할을 수행한다(25). IL-1 β 는 TNF- α 와 유사하게 초기 면역반응에 관여하여 감염부위를 최소화 시키

고, 후천면역에 관계되는 면역세포인 B 세포와 T 세포의 분화를 촉진시켜 후천면역반응의 개시반응을 빠르게 진행시키는 역할을 수행하며, IL-6는 B 세포와 T 세포를 자극시켜 항체생산 및 세포분화에 관계되는 사이토카인의 생성을 돕는다(26). 따라서 수지상세포에서 면역반응의 매개자 역할을 수행하는 사이토카인 분비능의 증가는 초기면역반응에 따른 과도한 염증 발생을 억제하고, B 세포, T 세포의 분화를 촉진시키거나, 그 기능을 조절하여 외부 병원성 항원의 침입에 따른 염증을 억제시키는데 중요한 역할을 수행한다. 본 연구에서 면역활성의 바이오마커로서 면역체계의 유지 및 보수와 밀접한 연관성을 가지는 사이토카인의 분비능에 관하여 관찰하였다.

PCP의 처리가 수지상세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 수지상세포에 PCP를 처리하여 배양 상등액에 존재하는 사이토카인의 함량을 ELISA법으로 측정 하였다(Fig. 3). 양성대조구인 지방질다당류 처리시, 모든 처리구에서 사이토카인 (TNF- α ; 1203.4 \pm 1.48 pg/mL, IL-6; 1241.2 \pm 1.3 pg/mL, IL-1 β ; 987.2 \pm 1.87 pg/mL, IL-12; 1037.2 \pm 1.89 pg/mL)의 ($n=3$) 분비량이 증가하는 것으로 관찰되었다. 농도별(1, 5, 및 10 $\mu\text{g/mL}$) PCP 처리구에서 TNF- α 의 분비량은, 372.3 \pm 0.32, 604.8 \pm 0.54 및 954.2 \pm 1.32 pg/mL ($n=3$)로 나타났으며, IL-6의 분비량은, 508.4 \pm 0.39, 761.5 \pm 1.34 및 1038.5 \pm 1.67 pg/mL ($n=3$)로 나타났으며, IL-1 β 의 분비량은, 314.5 \pm 1.04, 524.8 \pm 1.89 및 664.8 \pm 0.89 pg/mL ($n=3$)로 나타났으며, IL-12의 분비량은, 321.4 \pm 0.94, 832.5 \pm 0.85 및 901.1 \pm 0.94 pg/mL ($n=3$)로 PCP 처리 농도 의존적으로 사이토카인의 분비량이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과로 미

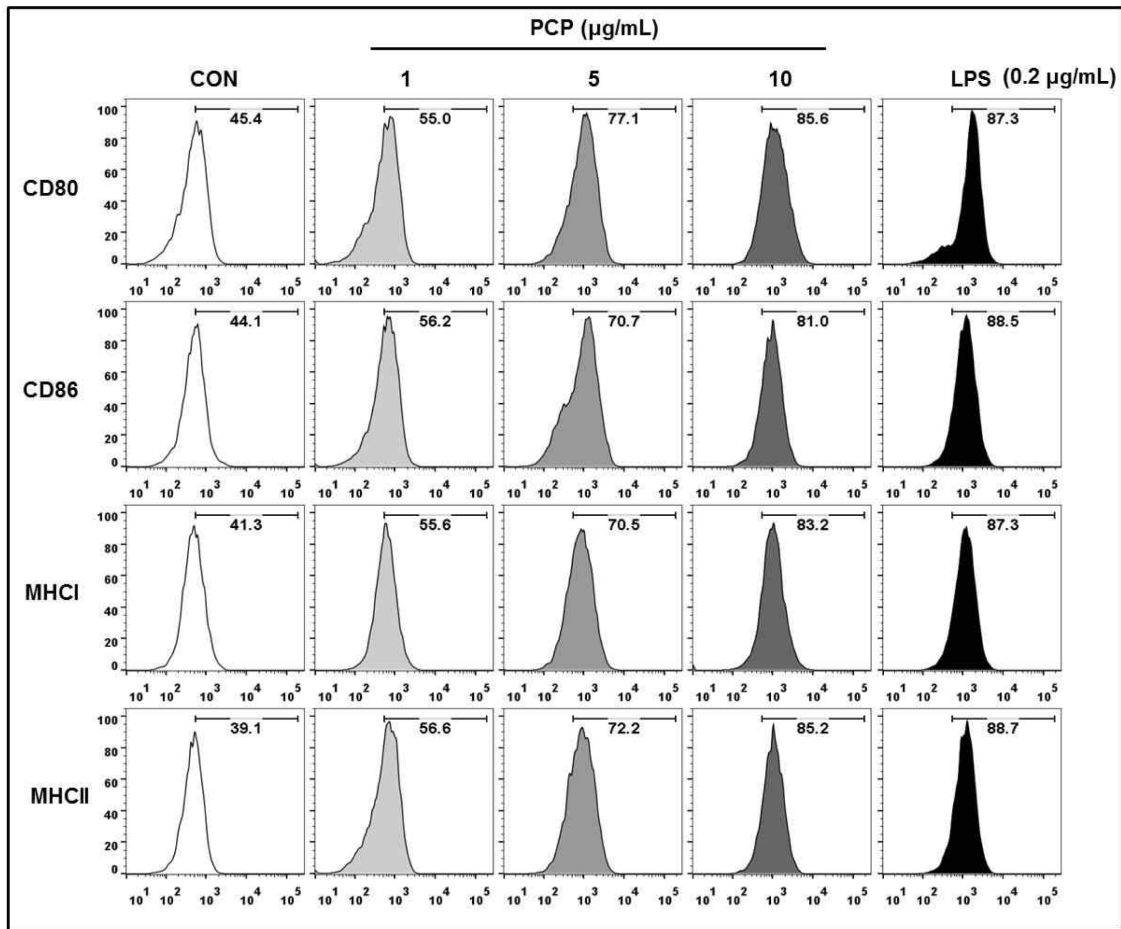


Fig. 4. Cell surface marker (CD80/86 and MHC class I/II) expression levels of crude polysaccharide from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (PCP) in bone-marrow derived dendritic cell. PCP was treated at the concentration of 1, 5, and 10 µg/mL. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2 µg/mL. After 24 h, cell surface marker expression was measured by flow cytometer using specific antibody.

루어 보아, 자소엽 다당류 추출물(PCP)의 처리는 수지상세포의 산화질소 분비능을 증가시키는 것뿐만 아니라, 사이토카인의 분비능을 조절하여 수지상세포의 면역활성에 기여하는 것으로 판단된다. 특히, PCP의 처리에 따른 IL-12 사이토카인 분비능의 증가는 적응면역계를 담당하는 T세포의 활성화를 유도하는데 있어서 Th1면역세포의 면역반응 유도를 촉진시키기 때문에 수지상세포의 활성을 통한 선천면역계의 활성화뿐만 아니라 후천면역세포의 활성화에서 매우 중요한 인자로 작용될 수 있다(27). Lee 등(28)의 연구에 따르면 동충하초 조다당 추출물의 처리한 결과, 선천면역계를 담당하는 대식세포의 세포증식을 증가시켰으며, 면역활성에 관여하는 다양한 사이토카인의 함량을 증가시키는 것으로 보고되고 있어, 본 연구에서도 자소엽 조다당 추출물을 처리한 결과와 유사한 결과를 나타낸다.

PCP 처리가 수지상세포의 세포 표면 활성 인자에 미치는 영향

PCP의 처리가 수지상세포의 활성화에 주는 영향을 직접적으로 평가해보기 위하여 수지상세포의 세포 표면에 부착된 세포 표면 활성 인자(cell surface activation marker)인 cluster of differentiation (CD) molecule의 발현에 관하여 유세포 분석기를 통하여 관찰하였다. 다양한 면역세포구들은 세포 표면에 가지고 있는 표면 분자구조에 따라 서로를 구분하며, 이러한 구분은 분화집단(CD

이라는 표현형을 사용한다(29). 이러한 표현형인 CD는 같은 종류의 세포를 분리하거나 분석하는 연구에도 매우 유용하게 사용되며, 세포의 활성화와 관련하여 중요한 지표로 이용된다(30). 또한 선천면역을 담당하는 탐식세포가 병원체를 탐식하게 되면 후천성 면역을 담당하는 T 세포에게 병원체의 항원을 제시하게 되는데, 이때 항원을 제시하는 과정에서 직접적으로 항원을 제시할 수 없고 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex; MHC)라고 하는 탐식세포 표면에 발현하는 단백질에 항원을 결합시켜서 전달한다(31). 탐식세포가 내재하고 있는 주조직적합성 복합체는 MHC class I과 II가 존재하며 이들은 탐식세포가 활성화되지 않았을 때는 세포 표면에 적은 양이 발현되지만 활성화 되면 발현되는 양이 현저히 증가하여 T 세포에 많은 양의 항원을 전달할 수 있으며, T 세포를 직접적으로 활성화시켜 후천성 면역반응을 활발히 진행시킨다(32). CD80, 86 또한 대식세포 및 수지상세포의 활성화를 나타내는 지표로서 이러한 분자들이 발현이 증가하게 되면 항원제시능력이 증가되고, T세포와의 세포-세포 상호작용(cell to cell interaction)을 돕는 역할을 수행한다. 따라서 주조직적합성 복합체 및 CD80, 86의 발현 증가는 탐식세포의 활성화에 매우 밀접한 관련이 있다(33).

본 연구에서는 PCP를 농도별로 처리하고 수지상세포가 활성화되었을 때 가지는 표현형인 CD80과 86 및 MHC class I과 II

의 발현에 관하여 유세포 분석기를 통하여 분석하였다(Fig. 4). PCP를 농도별(1, 5, 및 10 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 CD80과 86 및 MHC class I과 II의 발현에 관하여 관찰한 결과 PCP의 처리는 농도 의존적으로 세포표면 활성인자들의 발현을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 보아 PCP의 처리는 수지상세포의 세포 표면활성 인자들의 발현을 직접적으로 증가시켜 면역세포를 활성화시키는 것으로 사료된다.

PCP 처리가 비장세포의 생존율에 미치는 영향

비장은 생체 중요한 면역기관으로서 혈액에서부터 유래되는 외래항원에 대하여 주된 보호 면역을 수행하며, B 및 T 림프구의 성숙과 분화가 이루어지는 림프기관으로 이러한 림프구의 증식은 면역시스템에서 매우 중요한 의미를 갖게 된다(34). 비장에는 다양한 면역세포들이 존재하는데, 주로 T 세포가 60% 이상을 차지하며, 나머지는 B 세포 및 탐식세포들이 차지한다. 따라서 면역 증강물질의 면역활성을 확인하는 데 있어서 T 세포의 활성능에 관하여 평가하기 위하여 비장세포를 주로 사용한다(35). 본 실험에서도 수지상세포를 대상으로 PCP가 선천면역계의 면역활성을 유도한다는 것을 증명할 수 있었고, 후천면역계를 담당하는 T 세포에 대한 PCP의 면역활성 유도능에 관하여 알아보기 위하여 비장 조직으로부터 비장세포를 분리하여 PCP의 처리에 따른 비장세포의 세포독성에 관하여 평가하였다.

PCP의 처리에 따른 비장세포의 세포 생존율에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 마우스로부터 무균적으로 적출된 비장세포에 PCP를 농도별(1, 5, 및 10 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여, 비장세포의 증식능을 Fig. 5에 나타내었다. PCP 처리결과, 비장세포의 생

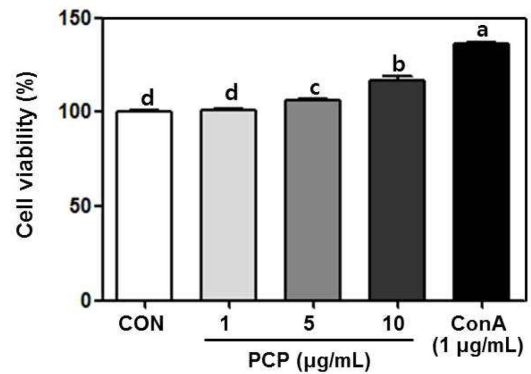


Fig. 5. Cell viability test of crude polysaccharide from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (PCP) in splenocyte separated from mouse spleen. PCP was treated at the concentration of 1, 5, and 10 $\mu\text{g/mL}$, and concanavalin A (ConA) was treated at the concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ as a positive control. After 24 h, splenocyte viability was evaluated by WST-1 assay. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and ^{abcd} values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

존율이 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리구(101.3 \pm 2.1%)에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았지만, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리구에서는 107 \pm 2.4% 및 118 \pm 4.9%로 비장세포의 생존율이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 PCP의 처리는 상기 제시된 농도에서 비장세포에 독성을 미치지 않는 것으로 사료되며,

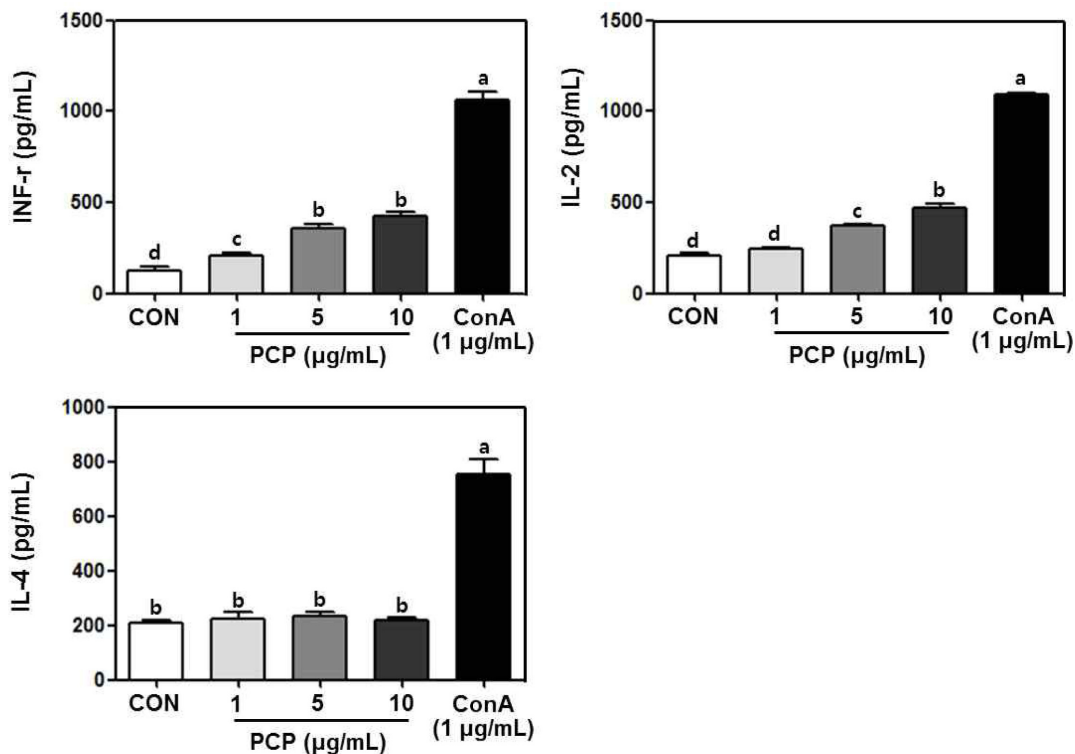


Fig. 6. Cytokine (IFN- γ , IL-2, and IL-4) productions activity of crude polysaccharide from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (PCP) in splenocyte separated from mouse spleen. PCP was treated at the concentration of 1, 5, and 10 $\mu\text{g/mL}$, and concanavalin A (ConA) was treated at the concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. The results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the Duncan's multiple range test and ^{abcd} values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

추후 PCP의 처리가 비장세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향에 관하여 동일 농도 범위에서 평가하였다.

PCP 처리가 비장세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향

면역 T 세포는 사이토카인과 일부 전사인자(transcription factor)들의 활성화에 의하여 Th1 세포와 Th2 세포로 분화하며 각각의 세포에서 분비되는 사이토카인의 경우 면역증강이나 알레르기 유발에 밀접한 관련이 있다고 보고된다(36). Th1 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로는 IL-2, IFN- γ 등이 있고 Th2 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로는 IL-4, 5, 10, 13이 있으며, 특히 Th1 세포가 분비하는 사이토카인이 증가할 경우 면역활성에 밀접한 관련이 있으며 Th2 세포가 분비하는 사이토카인이 증가할 경우 알레르기 질환이나 아토피 질환의 유발과 밀접한 상관관계가 있다고 보고된다(36). 본 연구에서도 PCP 처리가 비장세포의 사이토카인 분비 특성에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 Th1 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인인 IL-2, IFN- γ 와 Th2 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인인 IL-4의 분비능에 관하여 측정하였다(Fig. 6).

PCP를 농도(1, 5, 및 10 $\mu\text{g/mL}$)별 처리한 결과, IFN- γ 및 IL-2와 같은 Th1 세포가 분비하는 사이토카인의 분비가 유의적으로 증가되었으며, 대조적으로 Th2 세포가 분비하는 IL-4와 같은 사이토카인의 분비량에 대한 변화는 관찰되지 않았다. 본 연구에서 양성대조군으로 사용된 Con A의 경우 T세포의 대표적인 유사분열 촉진제로서 Th1/Th2세포가 분비하는 모든 종류의 사이토카인의 분비를 증진시키는 것으로 보고되고 있다(37). Byun(26)의 연구에 따르면 참모자반 조다당 추출물의 경우도 비장세포의 세포증식을 증가시켰으며, Th2사이토카인의 분비능에는 영향을 미치지 않고 Th1 사이토카인의 함량을 증가시켜 면역활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 따라서 PCP의 처리는 알레르기나 아토피 등의 질병 유발과 밀접한 관련이 있는 Th2 세포의 활성화에는 영향을 주지 않는 것으로 판단되며, 면역활성과 밀접한 관련이 있는 Th1 세포의 활성화를 통하여 비장세포의 활성을 유도하는 것으로 판단된다. 다당류들의 대부분은 포도당(glucose), 만노스(mannose), 갈락토스(galactose), 자일로스(xylose) 및 아라비노스(arabinose) 등의 육탄당 및 오탄당이 2개 또는 그 이상으로 연결되어 있는 복합구조를 가지고 있으며, 이러한 다당류들이 단순한 선형의 반복되는 구조를 가지고 있거나, 고차원의 겹가지 형태의 구조를 가지는지에 따라 다당류의 구조가 달라지며, 또한 분자량 변화에 따라서는 다당류의 기능적인 특성이 바뀌게 된다(38). 따라서 본 연구에서 자소엽 조다당 추출물을 다양한 면역세포에 처리하여 면역활성에 관하여 평가한 결과, 수지상세포의 산화질소 분비능, CD80/86, MHC class I/II 발현 및 사이토카인 분비능을 증가시키고, 비장세포에서 Th1 사이토카인의 분비능이 증가한 것은 자소엽에 함유된 조다당의 구조적 특성이나 분자량과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되며, 추후 분리 및 정제과정을 통하여 정제된 조다당 추출물의 생리활성에 관한 검증이 절실히 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 자소엽 조다당 추출물(PCP)의 면역활성에 관하여 알아보기 위하여, 선천면역계의 대표적인 면역세포인 수지상세포 및 후천면역계의 대표적인 면역세포인 비장세포에 PCP를 처리하여 면역세포의 면역활성능에 관하여 측정하였다. 수지상세포에 PCP를 1, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 처리한 결과, 세포생존율이

103.4 \pm 3.8, 108.8 \pm 2.1, 117.8 \pm 3.3% ($n=3$)로 나타나 세포독성을 유발하지 않았으며, 주요 면역활성 인자인 산화질소의 분비능을 관찰한 결과, 각각 2.7 \pm 0.2, 4.5 \pm 0.2, 7.3 \pm 0.3 μM ($n=3$)로 농도 의존적으로 나타났다. 농도(1, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$)별 PCP 처리구에서 사이토카인의 분비능을 관찰한 결과, TNF- α (372.3 \pm 0.32, 604.8 \pm 0.54 및 954.2 \pm 1.32 pg/mL), IL-6 (508.4 \pm 0.39, 761.5 \pm 1.34 및 1038.5 \pm 1.67 pg/mL), IL-1 β (314.5 \pm 1.04, 524.8 \pm 1.89 및 664.8 \pm 0.89 pg/mL), IL-12 (321.4 \pm 0.94, 832.5 \pm 0.85 및 901.1 \pm 0.94 pg/mL)가 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. 또한 후천면역에서 중요한 역할을 수행하는 면역 T 세포가 다량으로 분포하는 비장 조직으로부터 비장세포를 분리하여 PCP를 처리하였을 때, 세포 증식능이 유의적으로 증가하였으며, 면역활성을 유도하는 Th1 세포가 분비하는 사이토카인의 함량 또한 유의적으로 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 PCP의 처리는 선천면역뿐만 아니라 후천면역에 관여하는 다양한 면역세포의 활성화에 직간접적으로 관여하는 것으로 사료된다. 본 연구는 자소엽 조다당 추출물의 면역활성 유도 효과에 관한 가능성을 제시하였고, 향후 자소엽 조다당 추출물을 분리 및 정제과정을 통하여 구조분석 및 정제된 조다당 추출물의 정확한 면역활성과 면역활성 기전에 관한 면밀한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- Hong HD, Cho CW, Rhee YK, Choi HD, Lee HS. Status of technology development using immune-modulating polysaccharide. Food Sci. Ind. 45: 1-11 (2012)
- Jiang MH, Zhu L, Jiang JG. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. Expert Opin. Ther. Tar. 14: 1367-1402 (2010)
- Cha JH, Lim EM. Effects of *Gardeniae fructus* on cytokines in mouse macrophage. J. Korean Obstet. Gynecol. 27: 1-16 (2014)
- Erwig LP, Rees AJ. Macrophage activation and programing and its role for macrophage function in glomerular inflammation. Kidney Blood Press. R. 22: 21-25 (1999)
- But PPH, Kimura T, Guo JX, Sung CK, Han BH. International Collation of Traditional and Folk Medicine. World Scientific, Singapore. pp. 202-203 (1997)
- Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Inhibitory effect of perilla leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. Biol. Pharm. Bull. 26: 560-563 (2003)
- Oh HA, Park C, Ahn HJ, Park YS, Kim HM. Effect of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo and rosmarinic acid on allergic inflammatory reactions. Exp. Biol. Med. 236: 99-106 (2011)
- Makino T, Furuta Y, Wakushima H, Fujii H, Saito K, Kano Y. Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. Phytother. Res. 17: 240-243 (2003)
- Choi UK, Lee OH, Lim SI, Kim YC. Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *Pseudomonas aeruginosa* using the evolutionary operation factorial design technique. Int. J. Mol. Sci. 11: 3922-3932 (2010)
- Meng L, Lozano YF, Gaydou EM, Li B. Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. Molecules 14: 133-140 (2008)
- Kim DH, Kim YC, Choi UK. Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *Staphylococcus aureus* using evolutionary operation factorial design technique. Int. J. Mol. Sci. 12: 2395-2407 (2011)
- Fujita T, Funayoshi A, Nakayama M. A phenylpropanoid glucoside from *Perilla frutescens*. Phytochemistry 37: 543-546 (1994)
- Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, Ukita M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J, Nishino H, Nishino H. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 85-90 (2004)
- Zhao Q, Shepherd EG, Manson ME, Nelin LD, Sorokin A, Liu

- Y. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: Attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control. *J. Biol. Chem.* 280: 8101-8108 (2005)
15. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6: 317-333 (2006)
 16. Sim SM, Im GH, Kim JW, Lee UY, Kim HW, Lee MU, Lee TS. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Daedaleopsis tricolor*. *Kor. J. Mycol.* 31: 161-167 (2003)
 17. Lee HJ, Lee CW, Choi MS, Son DJ, Hong JT. Effects of esthetic essential oils on LPS-induced nitric oxide generation in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 32: 111-116 (2006)
 18. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 44: 143-161 (2002)
 19. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666 (1988)
 20. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 69: 625-625 (2001)
 21. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chia KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 76: 119-123 (2001)
 22. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin I, Rachlin EM. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 87-82 (1998)
 23. Lee K, Sohn Y, Lee MJ, Cho HS, Jang MH, Han NY, Shin KW, Kim SH, Cho IH, Bu Y, Jung HS. Effects of *Angelica acutiloba* on mast cell-mediated allergic reactions *in vitro* and *in vivo*. *Immunopharm. Immunot.* 34: 571-577 (2012)
 24. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 70: 93-103 (2004)
 25. Lee JH, Kim YS, Lim EM. Effects of *Angelicae Pubescentis Radix* water extract on immune property in RAW 264.7 macrophages. *J. Korean Oriental Med.* 32: 175-184 (2011)
 26. Byun EH. Comparison study of immunomodulatory activity of polysaccharide and ethanol extracted from *Sargassum fulvellum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1621-1628 (2015)
 27. Kim HS, Kang JS. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 109-116 (2008)
 28. Lee TS, Shim SM, Im KH, Kim JW, Lee UY, Shim MJ, Lee MW. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. *Kor. J. Mycol.* 31: 155-160 (2003)
 29. Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, Kim K, Han SS, Lee CK. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1275-1284 (2001)
 30. Kikuchi T, Ohno N, Ohno T. Maturation of dendritic cells induced by Candida beta-D-glucan. *Int. Immunopharmacol.* 2: 1503-1508 (2002)
 31. Piani A, Hossle JP, Birchler T, Siegrist CA, Heumann D, Davies G, Loeliger S, Seger R, Lauener RP. Expression of MHC class II molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. *Eur. J. Immunol.* 30: 3140-3146 (2000)
 32. Hegde NR, Chevalier MS, Johnson DC. Viral inhibition of MHC class II antigen presentation. *Trends Immunol.* 24: 278-285 (2003)
 33. Mo ZQ, Wang JL, Yang M, Ni LY, Wang HQ, Lao GF, Li YW, Li AX, Luo XC, Dan XM. Characterization and expression analysis of grouper (*Epinephelus coioides*) co-stimulatory molecules CD83 and CD80/86 postCryptocaryon irritans infection. *Fish Shellfish Immun.* 67: 467-474 (2017)
 34. 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.* 19: 176-182 (2006)
 35. Shan BE, Yoshida Y, Kuroda E, Yamashita U. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes *in vitro*. *Int. J. Immunopharmacol.* 21: 59-70 (1999)
 36. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145 (2001)
 37. Chen FY, Ye YP, Sun HX, Li HX, Shi H. Stemucronoside L, a pregnane glycoside from the roots of *Stephanotis mucronata*, inhibits Th1/Th2 immune responses *in vitro*. *Chem. Biodivers.* 6: 916-923b (2009)
 38. Lee SH, Ahn WY. Chemical constituents of saccharides and triterpenoids in the the korean native mistletoes. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 24: 28-36 (1996)