

가죽나무 에탄올 추출물에 의한 면역증강 효과

길나영 · 김순희 · 최보영 · 문지영* · 여수환** · †김소영*

농촌진흥청 국립농업과학원 발효가공식품과 연구원, *농촌진흥청 국립농업과학원 발효가공식품과 농업연구사,
**농촌진흥청 국립농업과학원 발효가공식품과 농업연구관

Immune Enhancing Effect by Ethanol Extract of *Ailantias altissima*

Na-Young Gil, Sun-Hee Kim, Bo-Young Choi, Ji-Young Mun*, Soo-Hwan Yeo** and †So-Young Kim*

Researcher, Fermented and Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

*Junior Researcher, Fermented and Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

**Senior Researcher, Fermented and Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Abstract

The aim of this study was to investigate the immune activity of *Ailantias altissima* as an active ingredient on the immune enhancement by mixing ethanol extract with lactic acid bacteria (LAB). The activity of NF- κ B/AP1 transcription factor increased by NF- κ B activity when mixed with LAB samples rather than with the extract alone. Nitric oxide (NO) production was similar in ethanol extract alone group and LPS treatment group. Mixing *Ailantias altissima* extract and lactic acid bacteria led to low NO production. The cytokine productivity of TNF- α significantly increased in *Ailantias altissima* extract when treated with LPS, and increased even more when mixed with lactic acid bacteria. The IL-1 β cytokine production was high when the *Ailantias altissima* extract were treated alone, but no IL-1 β cytokine was produced in the mixtures with isolates. The combination of the ethanol extract of the *Ailantias altissima* and the lactic acid bacteria was found to be effective in the immune function. Consequently, the ingredient to combine *Ailantias altissima* extract and lactic acid bacteria can be effectively used for development of the health functional food on the prevention and treatment of hyp免疫ities.

Key words: *Ailantias altissima*, immunity, lactic acid bacteria

서론

현대인들은 식생활변화, 스트레스, 흡연과 음주 등 내적 요인과 미세먼지, 황사 등 환경오염원의 노출 등 외적 요인에 의해 면역기능 저하, 건선, 아토피 등과 같은 면역 질환이 늘어남에 따라 식품을 소재로 하여 이들 질환을 치료 또는 예방하기 위한 목적으로 면역 관련 연구가 지속적으로 증가하고 있다. 건강기능식품 시장은 산업 간의 융합에 의해 새로이 창출되는 대표적인 시장으로 농업, 제약, 식품, 바이오, 생명기술 산업과 연구소, 대학, 전문가, 보건의료산업과 융합으로 기존의 기술을 뛰어넘는 신기술 개발로 현재 국내의 건강기

능식품 시장 규모는 2017년 3조 8,000억 원으로 성장하였으며, 시장은 더욱 커질 것으로 전망된다(KHSA 2017). 특히 건강기능식품 시장 중 기능성별 매출 현황은 17%로 면역기능 개선이 가장 높은 비중을 차지하였으며, 이어서 혈행 개선(16.3%), 항산화(16.1%)의 순으로 면역기능개선 제품에 대한 소비자 관심의 증가로 면역기능제품에 대한 시장도 크게 성장하고 있다(KFDA 2017).

생체 내 면역조절 기능이란 외부 요인으로부터 자기 자신을 보호하기 위한 생물체의 수단 중 하나로 각종 면역세포들은 침범한 항원들로부터 숙주를 방어한다. 이러한 면역세포들의 증식, 분화 등 작용기전은 여러 종류의 외부자극에 의해

† Corresponding author: So-Young Kim, Junior Researcher, Fermented and Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea. Tel: +82-63-238-3610, Fax: +82-63-238-3843, E-mail: foodksy@korea.kr

조절되고 활성화된다. 체내 질병이 발생된 상태는 면역 기능이 저하된 상태라고 전제하고, 암 환자 또는 노약자 등에서 면역능을 증진시킬 수 있는 물질을 추구하게 되었다(Lee 등 2011). 따라서 국내에서 현재 면역기능을 보유한 원료로 등록된 것은 식물소재로 인삼, 홍삼, 클로렐라 등, 미생물로 *Enterococcus faecalis* 가열처리분말, 청국장균 배양 정제물, 프로바이오틱스(*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) 등 24 종이 알려져 있다(KFDA 2016). 최근 연구된 식물소재로 참죽나무 잎 추출물의 면역증강 및 항산화 효과 등이 보고되어 있고(Kim 등 2018), 프로바이오틱스(probiotics)의 경우 다른 원생동물의 생육을 촉진하는 역할을 하는 살아있는 미생물을 지칭하며, 숙주 내 장내미생물의 균형을 유지시킴으로써 건강 증진 효과를 나타내는 활성 미생물 들을 말한다(Lee 등 2008, Yoon & Shin 2018). 특히, 유산균 중 *Lactobacillus* 속은 장내에 정상적으로 존재하는 균으로 면역증강, 항균, 항바이러스 효과 등을 나타내는 것으로 보고되었다(Gibson & Roberfroid 1995; Park 등 1998). 이러한 이유로 천연물 소재와 함께 건강한 사람의 장내 미생물로 존재하는 유산균이 면역시스템을 통하여 인체와 같은 숙주를 보호하여 주어 면역증강에 도움을 줄 수 있다는 연구가 활발히 진행되고 있는 것이다. 최근에는 면역 활성이 높은 유산균들 간 복합물, 식물소재와 유산균과의 복합물 등 보다 높은 기능성을 보유한 소재를 탐색하여 제품화하는 연구에도 관심이 높아지고 있다.

가죽나무(*Ailantias altissima*)는 소태나무과(Simaroubaceae)의 낙엽성 교목으로서 가죽나무라고 불리기도 하며(Lee YS 2007a), 가죽나무의 뿌리인 저근백피는 항균, 항바이러스, 소염, 살충 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Jeong 등 2003). 한방학적 효능으로는 맛은 쓰고 성질은 서늘하며 열을 내리고 습을 없애며, 산후출혈, 장출혈, 위궤양 등의 치료에도 사용하고, 설사와 출혈을 멈추게 하여 지사 및 지혈제로 사용된다(Lee 등 2007). 가죽나무에 함유되어 있는 성분은 페놀성 물질인 3,4,5-trimethoxyphenol, p-coumaric acid, vanillin, vanillic acid 등과 5,7-dihydroxychromone-7-neohesperidoside, naringin 등의 flavonoid 화합물(Lee 등 2002), merosin, tannin phlobaphen, ailanthone, amarolide, acetylamarolide 등이 분리·동정되었다(Kim 등 2005). 이들 성분들은 항균성(Hwang 등 2001), 급성 림프성 백혈병에 대한 항암 효과(Lee YS 2007b) 등의 생리학적 활성을 나타내는 연구가 진행되었다.

이에 본 연구에서는 선행연구(Hwang KA 2013)에서 면역 기능 개선 효과를 나타내어 기능성 소재로 발굴된 가죽나무 에탄올 추출물의 면역활성을 확인하고, 이 추출물과 유산균과의 혼합에 따른 *in vitro* 상에서 면역활성 증진 효과를 확인하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 가죽나무 시료 준비

본 실험에서 면역활성을 평가하기 위해 사용된 가죽나무(*Ailantias altissima*)는 국내산으로 수원지역 로컬마켓에서 구입하여 사용하였다. 추출물 제조에 앞서 동결 건조기(Ilshin Lab Co., Ltd, Korea)를 이용하여 동결 건조 과정(5~7 days, 20 torr, rack temp. -45°C , trap temp. -70°C)을 거친 후 분쇄하여 분말 형태로 제조하였다.

2. 에탄올 추출물의 조제

건조 시료로부터 추출물을 만드는 과정은 분말 형태가 된 가죽나무 시료를 일정량 칭량한 후, 그 중량의 10배에 해당하는 양만큼 70% 에탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 170 rpm으로 교반추출기(Jeitech, Shaker, SK-71)를 이용하여 추출하였다. 상층액은 모으고 잔여물은 처음에 사용한 만큼의 70% 에탄올을 다시 첨가하여 처음 단계를 반복하는 과정을 거쳐 2회 추출한 것을 모아 여과지(Advantec No. 6)로 여과한 다음, 회전진공농축기(EYELA, CCA-110, Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 제거하며 농축하고, 동결건조하였다(5 내지 7 일, 20 torr, rack temp. -45°C , trap temp. -70°C). 이렇게 얻어진 가죽나무 에탄올 추출물의 건조분말은 실험을 시작하기 전까지 -70°C deep freezer에 보관하였다. 이후 실험을 위하여 추출물 분말은 DMEM 배지로 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 맞추어 시료 추출물을 조제하여 사용하였다.

3. 유산균 배양

가죽나무 에탄올 추출물과 유산균과 혼합하여 면역 활성을 평가하기 위해 사용된 *Weissella cibaria* JW15(KACC 91811P)와 *Lactobacillus plantarum* 4-25(KACC 91936P) 분리균주는 충북대학교 수의과대학에서 분양받아 실험에 사용하였으며, 선행연구(Noh GM 2015)에서 프로바이오틱 기능과 면역활성을 가진 유산균으로 선발되었는데, 이번 실험의 비교균주로 사용하였다. *Lactobacillus rhamnosus* GG는 상업용 균주로서 면역 기능성을 보유한 균주로 잘 알려져 있어 이번 실험에 대조균 균주로 사용하였다. 상기 균주들은 4°C 에서 냉장 보관하면서 유산균 증식용 배지인 lactobacilli MRS broth(Difco, USA)에서 2주마다 계대 배양하였으며, 실험에 사용 전까지 멸균된 50% glycerol를 넣은 배지에 균체를 현탁하여 -70°C 의 deep freezer에 보관하였다.

이들 균주들은 MRS 액체배지로 37°C 에서 24시간 배양한 후 각 균주들은 생균과 사균으로 구분하여 시료를 준비하였다. 배양액은 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리(Gyrogen, Labogene, 1580 R)한 후 상층액을 제거하고, PBS로 희석하여

흡광도(O.D.660 nm)를 측정하여 0.5 농도로 맞추어 생균 시료로 사용하였으며, 사균의 경우는 원심분리한 생균을 100°C에서 15분간 열처리하여 상층액 제거 후 PBS로 희석하여 흡광도 0.5 농도로 맞추어 실험에 사용하였다.

4. 세포 배양

대식세포는 선천성 면역을 담당하는 면역세포로서 생체 내 모든 조직에 분포되어 병원체 등으로 인한 염증 반응 시에 NO 및 염증성 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있어, 가죽나무(*Ailantias altissima*) 추출물의 면역활성을 평가하기 위해, RAW-Blue™ 세포를 배양하여 실험하였다(Higuchi 등 1990).

RAW-Blue™ 세포는 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco-Invitrogen) 및 1% penicillin-streptomycin(Gibco)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco-Invitrogen) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 계대는 2일에 한번씩 시행하였으며, RAW-Blue™ 세포를 활성화시키기 위해 주 1회는 Zeocin™(InvivoGen, USA)이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다.

5. 세포 생존율 측정

RAW Blue™ 세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 환원 방법을 이용하여 측정하였다(Je 등 2009). MTT에 의한 세포 성장률의 측정은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium이 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide]으로 환원되는 정도를 측정하는 검사법으로 이 과정에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것으로 알려져 있다(Mosmann T 1983).

RAW-Blue™ 세포는 1×10⁵ cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하였고, 24시간 동안 배양한 후 10, 50, 100, 500 µg/mL 농도의 시료 추출물을 처리하였으며, 대조군에는 배지를 동량으로 처리하였다. 각 plate는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하여 MTT assay를 수행하였다. 배양 완료 후 PBS(Gibco, USA)를 이용하여 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액을 각 well에 200 µL씩 첨가하여 알루미늄 호일로 빛을 차단한 상태에서 4시간 동안 다시 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 후 배지를 제거하고 DMSO(Dimethyl sulfoxide, Sigma Chemical Co., USA) 150 µL를 각 well에 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 뒤 microplate reader(SpectraMax M2, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식률은 각각 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대

한 백분율(%)로 나타내었다.

세포 증식률(%) =

$$\left(\frac{\text{시료의 흡광도값}}{\text{Blank의 흡광도값}} \right) \times 100$$

6. NF-κB 전사인자 활성능

대식세포에서 NF-κB는 cytokines와 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 toll like receptor ligands를 포함한 다양한 자극인자에 노출되면 IκB(inhibitor of NF-κB)의 인산화에 의하여 빠르게 활성화되어 핵 안으로 이동됨으로써 면역반응에 관여하는 유전자들의 transcriptional activator로 작용하는 것으로 알려져 있다(Bauerle & Baltimore 1988). 또한, AP-1은 NF-κB와 함께 대식세포의 활성화에 관여하는 주요 전사조절인자로 NF-κB/AP-1에 의한 유전자 발현 조절은 대식세포 활성화를 평가하는데 보편적으로 활용된다. 이번 실험에 사용된 RAW-Blue™ 세포는 NF-κB/AP-1 reporter cell line(RAW-Blue™ cells, InvivoGen, USA)으로 mouse RAW 264.7 macrophages에서 유래된 세포로 NF-κB/AP-1-inducible SEAP reporter 유전자를 가지고 있어 면역반응에 의해 자극되면 활성화되어 지시약(Quanti blue)에 의해 색변화가 일어나 활성화 여부를 판단할 수 있다(Xie 등 2011).

RAW-Blue™ 세포는 1×10⁵ cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였고, 그 다음 100 µg/mL 농도의 가죽나무 추출물을 단독으로 처리하거나, 660 nm에서 OD값 0.5에 해당하는 유산균과 시료 추출물을 1:1, 1:0.5, 1:0.25의 비율에 맞춰 복합으로 처리하여 24시간 다시 배양하였다. 상층액 20 µL와 Quanti blue(InvivoGen, USA) 시약 200 µL를 혼합하여 암실에서 10분 반응시킨 후 microplate reader(SpectraMax M2)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 LPS(lipopolysaccharide, *Escherichia coli* O11:B4, Sigma) 100 ng/mL의 농도를 처리한 것으로 사용하였으며, LPS를 처리하지 않은 것을 음성 대조군으로 사용하였다.

7. Nitric oxide(NO) 생성량

NO는 외부상처에 대한 반응 및 염증 같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 cytokines인 interleukin 1(IL-1)이나 tumor necrosis factor(TNF) 등에 유도된 inducible nitric oxide synthase(i-NOS)에 의하여 생성되며, 혈액응고, 혈압 및 신경 전달 기능의 조절 등 생리적 역할을 하지만, 고농도의 NO 생성은 peroxynitrite, nitrogen dioxide와 같은 유해물질을 생성하여 암의 형성과 진행하는 역할을 하고, 세포내 유해한 산화물질의 축적, DNA 손상을 일으키며, mitochondria에 감지되어 cytochrome C, apoptosis inducing factor를 방출하게 하여 세포자살을 초래하는 것으로 알려져 있다(Ide & Lau 2001; Bosca

등 2005).

RAW-Blue™ 세포를 1×10^5 cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양시킨 후 100 μ g/mL 농도의 시료 추출물을 단독으로 처리하거나 660 nm에서 OD값 0.5에 해당하는 유산균과 시료 추출물을 1:1, 1:0.5, 1:0.25의 비율에 맞춰 혼합하여 처리하여 24시간 동안 다시 배양하여 상층액을 얻었다. 상기 상층액 50 μ L와 Griess reagent(Promega) I (Sulfanilamide solution) 및 II (NED solution)를 동량으로 섞어 제조한 시약 100 μ L를 혼합하여 상온에서 10분 반응시킨 후 microplate reader(SpectraMax M2)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide의 농도는 아질산나트륨의 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

8. 세포활성물질(Cytokine) 측정

대식세포가 자극되면서 다양한 염증인자들이 증가되는데, 그 중 TNF- α 와 IL-6는 대표적인 염증성 사이토카인으로 림프구나 대식세포 등에서 생성되어 염증반응에 관여한다(Kim 등 2017).

RAW-Blue™ 세포를 1×10^5 cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양하였고, 그 다음 100 μ g/mL 농도의 가죽나무 추출물을 단독으로 처리하거나 660 nm에서 OD값 0.5에 해당하는 유산균과 시료 추출물을 1:1, 1:0.5, 1:0.25의 비율에 맞춰 복합으로 처리하여 24시간 다시 배양하였다. 그리고 상층액을 취하여 효소결합면역흡착검사(Enzymelinked Immunosorbent Assay: ELISA)를 이용한 ELISA kit(ebioscience, San Diego, California, USA)로 사이토카인 함량을 측정하였다. 사이토카인(TNF- α 와 IL-1 β)의 항체(Mouse TNF- α ELISA Ready-Set Go 및 Mouse IL-1 β ELISA Ready-Set Go, ebioscience)가 코팅되어 있는 각각의 well plate에 상층액 시료 100 μ L를 넣어 상온에서 2시간 반응시킨 후, 상층액을 제거하고, PBS와 Tween 20(Sigma)을 섞어 만든 washing buffer로 5회 이상 세척하였다. Detection antibody 용액을 넣어 항체와 반응시킨 후, Avidin과 결합된 Horseradish Peroxidase(HRP) 효소를 넣어 상온에서 15분 반응시켰다. 이 후, HRP 효소에 대한 기질로 TMB 용액을 넣어 반응시켜 색상의 변화를 확인하였다. 시료에 사이토카인이 생성되어 존재하면 색상의 변화가 나타나므로, 이 변화를 통해 사이토카인(TNF- α 와 IL-1 β) 생성량을 측정하였다. Stop solution(H₂SO₄)을 넣어 HRP 효소와 TMB 기질의 반응을 종결시킨 후, microplate reader(SpectraMax M2)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 통계처리

본 연구의 실험결과들은 각 처리구 시료에 대하여 3회 반복 측정하여 이루어졌으며, 모두 평균값 \pm 표준편차로 나타내

었다. 각 실험구 간의 유의성($p < 0.05$) 검증을 위해 통계적 분석은 SAS(Statistical Analysis System program, SAS Institute., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 대조군과 LPS 처리군 대비 시료 처리 효과는 student *t*-test 결과에 따라 유의성을 제시하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 증식에 미치는 영향

본 실험에 앞서 가죽나무 에탄올 추출물 시료가 RAW-Blue™ 세포주 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 가죽나무 원재료를 70% 에탄올로 추출하여 제조한 추출물의 수율은 7.08%이었고, 이를 DMEM 배지를 사용하여 10, 50, 100, 그리고 500 μ g/mL 농도로 제조하여 세포에 처리하였다(Fig. 1). 그 결과, 가죽나무 에탄올 추출물은 10, 50, 100 μ g/mL에서는 세포에 대한 독성은 보이지 않았으며, 100 μ g/mL 농도에서 처리하였을 때 대식세포가 활성화되어 세포 증식률이 증가하는 결과를 나타내었으며, 500 μ g/mL 농도로 처리한 경우에 세포증식률이 43%로 낮아 세포 독성을 나타내었다. Seo 등 (2018)의 가죽나무(*Ailanthus altissima*)의 수피 또는 근피를 건조시킨 저백피 추출물 100 μ g/mL 이하에서 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 나타내지 않는다고 본 연구와 같은 결과를 나타내었다. 본 실험에서는 가죽나무 70% 에탄올 추출물의 농도가 세포독성이 나타나지 않는 가장 높은 세포증식 효과를 나타낸 100 μ g/mL 농도를 선택하여 면역활성 실험을 진행하였다.

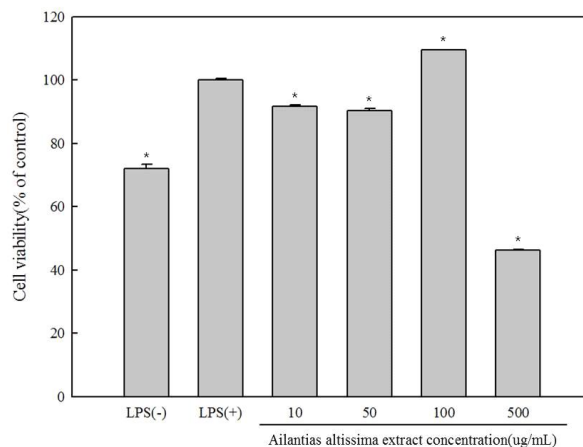


Fig. 1. Effect of *Ailantias altissima* ethanol extract on cell viability in RAW-BLUE cells. RAW-BLUE cells(1×10^5) in 96-well plates were incubated with and without indicated various concentrations (10, 50, 100, 500 μ g/mL) of *Ailantias altissima* ethanol extract for 24 hr. Cell viability was estimated by the MTT assay.

2. 유산균(생균)과 가죽나무 추출물 혼합에 의한 면역활성 비교

1) NF-κB 전사인자 활성능

유산균은 프로바이오틱스로서 장내 미생물의 균형 유지 및 숙주의 면역시스템 조절 등을 통해 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물로 주목받고 있다, 특히 *Lactobacillus rhamnosus* GG의 경우, Zhang 등(2005)에 따르면 일정한 수준에서 NF-κB의 신호전달체계를 활성화시켜 면역기능을 촉진하는 것으로 잘 알려져 있다. 이에 Lee HC(2015)의 선행연구에서 면역 활성을 보고한 우리나라 김치에서 유래된 *Weissella cibaria*와 *Lactobacillus plantarum* 등 2종과 함께 가죽나무 추출물 처리에 따른 면역 활성에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

본 실험에서는 가죽나무(*Ailantias altissima*) 추출물 단독 처리군과 가죽나무 추출물을 유산균(live probiotics)과 함께 혼합한 복합군을 RAW-Blue™ 세포에 처리하여 발현되는 NF-κB/AP1 전사인자의 활성을 측정하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

LPS를 처리한 경우에 비처리군과 가죽나무 추출물 시료보다 높은 활성을 나타냄을 확인하였으며, 가죽나무 추출물 단독 처리보다 유산균(live probiotics)과 혼합해서 처리하였을 때 NF-κB 활성능이 높게 나타났다. 특히, *Weissella cibaria* JW15 생균주의 경우, 가죽나무 추출물과의 혼합비율이 낮을수록 (1:0.25) 농도 의존적으로 NF-κB 활성이 증가하였는데, Kang 등(2004)이 보고한 바와 같이 가죽나무에 의한 *Bacillus subtilis*에 대한 항균작용이 동일한 Gram 양성균인 유산균에 대해서도 생육에 영향을 주어 가죽나무 추출물의 처리 농도가 낮을수록 활성이 높게 나타난 것으로 사료된다.

2) Nitric oxide(NO) 생성량

가죽나무(*Ailantias altissima*) 추출물과 가죽나무 추출물을

유산균(live probiotics)과 혼합하여 면역활성을 평가하기 위해, nitric oxide(NO) 생성량을 확인하여 Fig. 1에 나타내었다.

가죽나무 추출물을 유산균(live probiotics)과 혼합하여 처리한 결과는 LPS 처리, LPS 무처리, 가죽나무 추출물 단독 처리했을 때보다 모두 낮은 NO 함량을 나타내었다. 가죽나무 추출물만 처리하면 대조군에 비해 NO 생성량이 높아져 활성을 나타내지만, 추출물과 유산균의 혼합처리 시 NO의 생성량을 크게 줄여 유산균이 NO 생성량을 낮추는데 관련한 것으로 사료된다. 이번 실험에서도 생균과 가죽나무 추출물의 농도가 낮을수록 농도 의존적으로 점차 생성량이 높아졌으나, 군주별로 차이가 크게 나타나지 않았다.

3) 세포활성물질(Cytokine) 측정

가죽나무(*Ailantias altissima*) 추출물과 가죽나무 추출물을 유산균(live probiotics)과 혼합하여 면역활성을 평가하기 위해, 대식세포에 LPS와 함께 처리하면 생성되는 세포활성물질 중 TNF-α와 IL-1β의 생성량을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다.

Weissella cibaria JW15 생균을 가죽나무 추출물과 혼합한 경우, LPS 처리군보다 높은 TNF-α 활성을 보였으며, 특히 생균과 추출물의 혼합비율이 낮을수록 농도 의존적으로 높은 값을 나타내었다. *Lactobacillus plantarum* 4-25 균주와 가죽나무 추출물을 혼합한 경우에는 TNF-α 생성량 증가 효과는 나타나지 않았으며, *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주와 가죽나무 추출물을 혼합한 경우, 1:0.5 혼합비율일 때 TNF-α 생성량이 유의적으로 높았으나 효과는 크지 않았다. IL-1β 사이토카인은 가죽나무 추출물을 단독으로 처리하였을 때 생성량이 높았지만, 균주와의 혼합에 의해서는 IL-1β 사이토카인이 생성되지 않았다. Rangavajhyala 등(1997)의 연구에 따르면 *Lactobacillus acidophilus*의 세포벽 성분이 TNF-α의 생성을 촉진하였다고 보고하여 유산균의 함량이 높을수록 TNF-α의 생성량이 증가한 본 실험과 유사한 경향을 보였다.

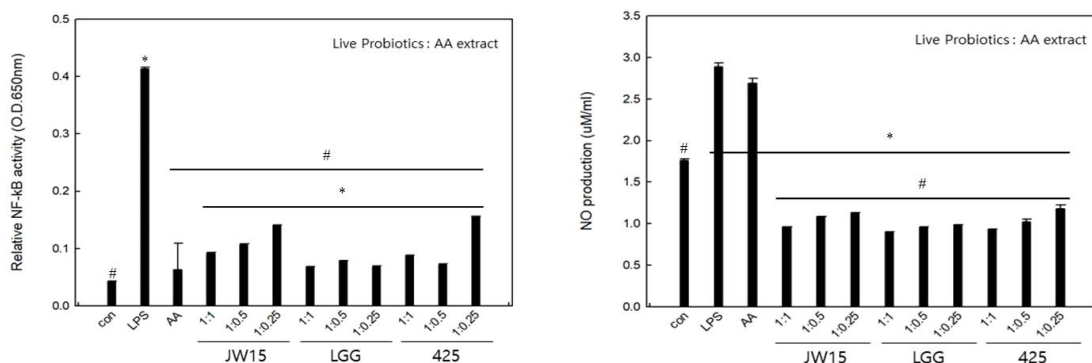


Fig. 2. Effects of *Ailantias altissima* extract & mixing the ethanol extract and lactic acid bacteria (live probiotics) on the production of NF-κB and NO in RAW-Blue™ cell. The data represent the mean±S.D. of triplicate experiments. * $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. LPS.

3. 유산균(사균)과 가족나무 추출물 혼합에 의한 면역활성 비교

1) NF- κ B 전사인자 활성능

사람에게 유익한 기능을 하는 프로바이오틱스는 생균에서 뿐만 아니라, 열로 사멸된 유산균(사균)을 경구 투여하여도 면역증강 활성에 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Yoshitaka 등 2006). 이에 본 실험에서는 사균 형태의 유산균(killed probiotics)과 함께 가족나무(*Ailantias altissima*) 추출물을 혼합 처리하여 면역활성을 비교하였다. Fig. 3에 RAW-Blue™ 세포에 시료를 처리하여 발현되는 NF- κ B/AP1 전사인자의 활성 측정 결과를 나타내었다.

추출물과 사균의 혼합으로 LPS 처리군보다는 낮으나, 생균의 혼합보다 높은 활성능을 나타내었으며, *Weissella cibaria* JW15와 *Lactobacillus plantarum* 4-25 균주는 추출물의 혼합비율이 낮을수록 농도 의존적으로 활성능이 높게 나타났다. *Weissella cibaria* JW15의 경우는 Lee HC(2015)의 연구를 통해 사람의 말초혈액 단핵세포(PBMC)에 생균 형태로 처리하였을 때도 NF- κ B, ERK, p38 및 JNK 등 여러 신호전달 경로를 활성화 시킨다고 보고하여 면역기능을 보유한 것을 확인할 수 있었다. 특히 Yoshitaka 등(2006)이 보고한 유산균과 동일한 균주인 *Lactobacillus plantarum* 4-25 사균의 경우, 가족나무 추출물과 1:0.25 비율로 혼합 시 가장 높은 활성능을 나타내었다.

2) Nitric oxide(NO) 생성량

가족나무(*Ailantias altissima*) 추출물과 가족나무 추출물을 유산균(killed probiotics)과 혼합하여 면역활성을 평가하기 위해, Nitric oxide(NO) 생성량을 확인하여 Fig. 3에 나타내었다. 3가지 균주를 가족나무 추출물과 혼합한 결과에서도 마찬

가지로 추출물 첨가 농도가 낮을수록 농도 의존적으로 NO 생성량이 증가하는 것을 확인하였는데, *Lactobacillus plantarum* 4-25 균주는 나머지 두 균주와 달리 LPS 무처리군보다 더 낮은 생성량을 보였다. 반면, *Weissella cibaria* JW15와 *Lactobacillus rhamnosus* GG는 추출물의 첨가 비율이 가장 낮은 1:0.25(killed probiotics: AA extracts)에서는 LPS 무처리군보다는 높고, LPS 처리군과 추출물 단독 처리군보다는 낮은 NO 생성능을 보였다. Kim 등(2018)의 밀누룩에서 분리한 유산균을 열처리하면 사멸시킨 사균을 이용하여 NO를 측정해 본 결과, 유산균의 농도가 높을수록 NO가 증가하는 경향을 보여 본 실험에서 추출물량이 적을수록 높은 값을 나타낸 것은 대식세포에 대한 유산균의 자극이 많아져 NO 생성량이 증가한 것으로 사료된다.

3) 세포활성물질(Cytokine) 측정

가족나무(*Ailantias altissima*) 추출물과 가족나무 추출물을 유산균(killed probiotics)과 혼합하여 면역활성을 평가하기 위해, 대식세포에 LPS와 함께 처리하여 생성되는 세포활성물질 중 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다.

Lactobacillus plantarum 4-25 사균과 가족나무 추출물을 혼합한 경우, TNF- α 사이토카인은 LPS 처리군보다 낮은 생성량을, IL-1 β 사이토카인은 생성되지 않았다. *Lactobacillus rhamnosus* GG 균주와 가족나무 추출물을 혼합한 경우, TNF- α 생성량은 LPS 처리군과 비슷한 수준을 나타내었지만, IL-1 β 생성량은 *Lactobacillus rhamnosus* GG 사균과의 혼합에서는 유일하게 생성량을 나타내었다. 이는 농도 의존적으로 나타났으며, 추출물의 혼합비율이 가장 낮은 1:0.25(killed probiotics : AA extracts)에서는 추출물의 단독 처리 시에 나타난 IL-1 β 생성량 수준까지 높은 생성량을 나타냈다. *Weissella cibaria* JW15

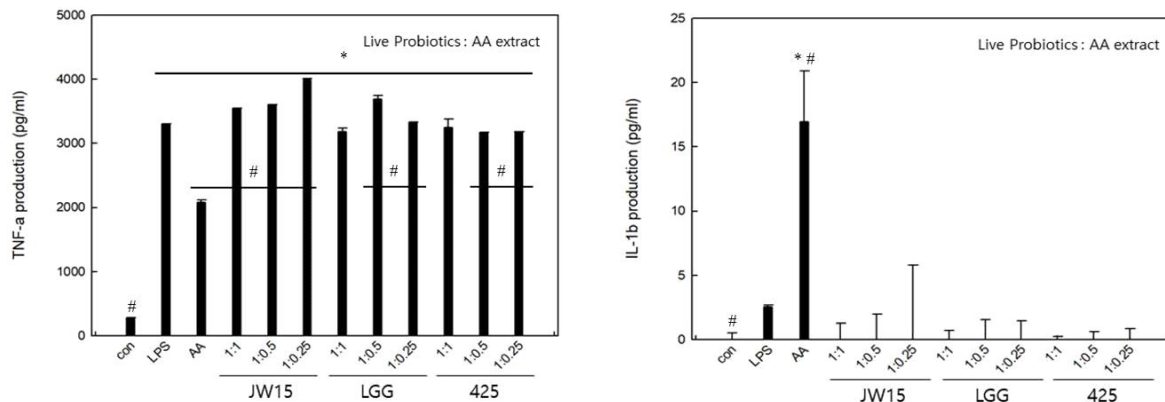


Fig. 3. Effects of *Ailantias altissima* extract & mixing the ethanol extract and lactic acid bacteria (live probiotics) on the production of cytokines (TNF- α , IL-1 β) in RAW-Blue™ cell. The data represent the mean \pm S.D. of triplicate experiments.

* $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. LPS.

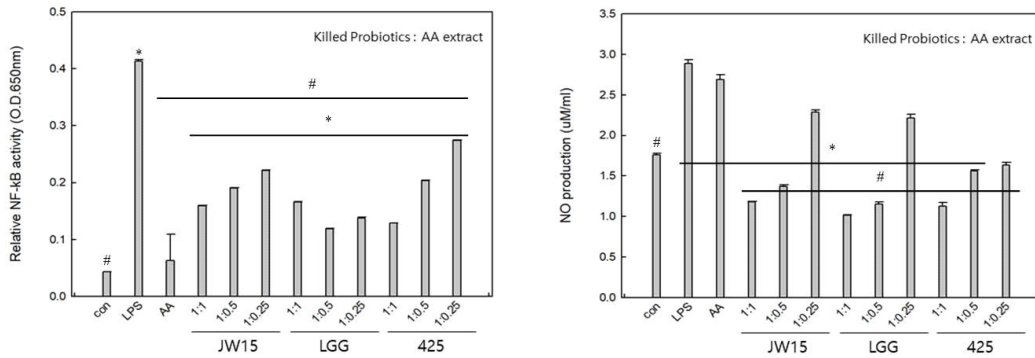


Fig. 4. Effects of *Ailantias altissima* extract & mixing the ethanol extract and lactic acid bacteria (killed probiotics) on the production of NF- κ B and NO in RAW-Blue™ cell. The data represent the mean \pm S.D. of triplicate experiments. * p <0.05 vs. control, # p <0.05 vs. LPS.

균주와 가죽나무 추출물을 혼합한 경우, TNF- α 생성량은 LPS 처리군보다 농도 의존적으로 높았으나, IL-1 β 사이토카인 생성량은 나타나지 않았다. Chang 등(2015)의 식물성 유산균인 *L. plantarum* 균주를 열처리를 통해 사멸시켜 TNF- α 생성량을 측정 한 연구 결과에서 10^4 CFU/mL 수준으로 처리하였을 때 유의적으로 증가하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

요약 및 결론

본 연구는 가죽나무(*Ailantias altissima*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 소재를 개발하기 위하여 수행한 것으로, 가죽나무 에탄올 추출물 단독 또는 면역능을 보유한 유산균과의 혼합처리에 의한 면역 활성능을 비교 분석하였다.

가죽나무 에탄올 추출물에 의한 대식세포 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과, 10~500 μ g/mL 농도 범위로 처리하였을 때 100 μ g/mL 농도에서만 대식세포가 활성화되어 높은 세포

증식률을 나타내었다.

NF- κ B 활성 평가에서는 유산균과 가죽나무 추출물을 1:0.25 비율로 혼합해서 처리하였을 때 추출물을 단독 처리하였을 때보다 NF- κ B 활성능이 증가하였는데, 생균보다 사균과 함께 처리하였을 때 그 값이 더 높았다. 특히 *Lactobacillus plantarum* 4-25 사균과 추출물을 1:0.25 비율로 혼합 시 가장 높은 활성능을 나타내었다.

Nitric oxide(NO) 생성량은 가죽나무 에탄올 추출물의 단독 처리에 의해 5.46 ± 0.06 μ M/mL로 LPS 처리 대조군(5.73 ± 0.06 μ M/mL)과 유사하게 가장 높은 값을 보였지만, 혼합 처리군에서도 *Weissella cibaria* JW15와 *Lactobacillus rhamnosus* GG 등 사균과 가죽나무 추출물을 1:0.25 비율로 처리하였을 때만 대조군보다 높은 생성량을 보였다.

TNF- α 와 IL-1 β 등 사이토카인 생성량에서는 가죽나무 추출물 단독처리군보다 유산균들과의 혼합처리군에서 모두 높은 값을 나타내었는데, 특히 *Weissella cibaria* JW15 균주를 추출물과 혼합한 경우에만 LPS 처리군보다 높은 TNF- α 활성

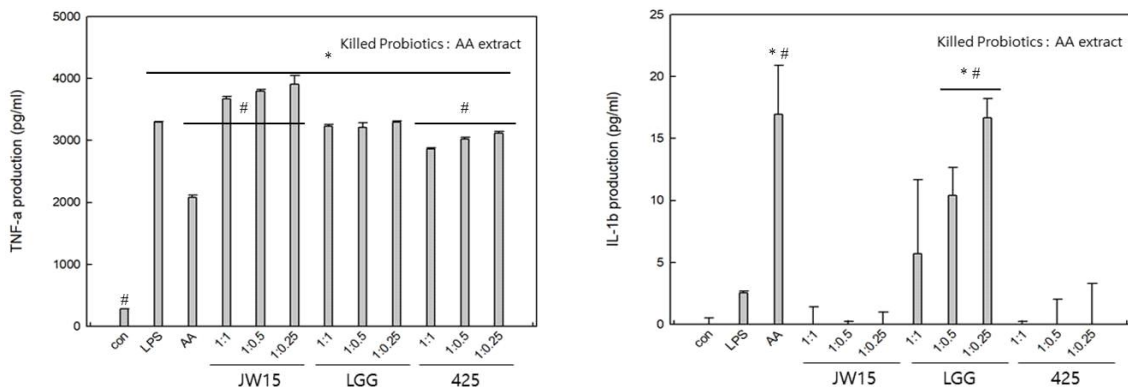


Fig. 5. Effects of *Ailantias altissima* extract & mixing the ethanol extract and lactic acid bacteria (killed probiotics) on the production of cytokines (TNF- α , IL-1 β) in RAW-Blue™ cell. The data represent the mean \pm S.D. of triplicate experiments. * p <0.05 vs. control, # p <0.05 vs. LPS.

을 보였고, 생균과 사균 간의 큰 차이 없이 1:0.25 비율로 혼합 시 가장 높은 생성량을 보였다. IL-1 β 생성량은 *Lactobacillus rhamnosus* GG 사균과의 혼합에서는 1:0.25 비율로 처리하였을 때 높은 값을 나타내었고, 가죽나무 추출물 단독 처리와 유사한 수준을 나타내었지만, 나머지 혼합군에서는 IL-1 β 가 검출되지 않았다.

종합적으로 살펴보면 가죽나무 에탄올 추출물과 유산균주와의 혼합에 의한 면역 활성능을 확인한 결과, 가죽나무 추출물 단독처리보다 유산균과 가죽나무 추출물을 1:0.25 비율로 처리한 혼합물에 의해 높은 면역활성능을 보여, 가죽나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 소재를 활용하여 면역 저하증 예방 및 치료용 등 건강기능식품 개발을 위하여 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업기초기반 연구개발사업(PJ013456)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

- Baeuerle PA, Baltimore D. 1988. I kappa B: A specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242:540-546
- Bosca L, Zeini M, Traves PG, Hortelano S. 2005. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: A role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology* 208:249-258
- Chang BY, Han JH, Cha BS, Ann SH, Kim SY. 2015. Optimization of culture condition for enhancing the probiotics functions. *J Food Hyg Saf* 30:295-301
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401-1412
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144:1425-1431
- Hwang KA. 2013. Investigation of natural material on immunity improvement by regulation of molecular reaction. National Academy of Agricultural Science
- Hwang SG, Hyung CL, Chun KK, Hyun JC, Seung IJ, Byung HJ 2001. Induction of apoptosis in Jurkat T lymphocytes by extract of *Ailanthus altissima*. *Korean J Pharmacogn* 32: 274-279
- Ide N, Lau BHS. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J Nutr* 131:1020S-1026S
- Je JY, Park PJ, Kim EK, Ahn CB. 2009. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of *Bambusae caulis* in liquamen. *Food Chem* 113:932-935
- Jeong YM, Park SK, Lee KJ, Kim YM, Yun YG, Kim WS, Han DM, An WG, Yoon YS, Jeon BH. 2003. Effect of *Ailanthus altissima* on the apoptosis and cell cycle of HL-60 leukemia cell line. *Korean J Orient Physiol Pathol* 17:914-922
- Kang SC, Park S, Seo HJ, Tae UH, Oh JH. 2004. Novel natural antimicrobial agents based on plants for improvement in storage stability of fruits and vegetables and process of preparation thereof. *KR Patent* 10-0465831-0000
- Kim EJ, Song BN, Jeong DS, Kim SY, Cho YS, Park SY. 2017. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of fermented turmeric (*Curcuma longa* L.) by *Rhizopus oryzae*. *J Life Sci* 27:1315-1323
- Kim GS, Choe YH, Kim HK, Kim BS. 2018. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from traditional wheat nuruk and their effects on nitric oxide production in mouse macrophage. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 33:192-199
- Kim HJ, Cho SY, Kim JB, Kim HW, Choe JS, Jang HH. 2018. Effects of the *Cedrela sinensis* A. Juss. leaves on the alcohol-induced oxidative stress in the human hepatic HepG2 cells. *Korean J Food Nutr* 31:464-470
- Kim KW, Baek JK, Jang YW, Kum EJ, Kwon YS, Kim HJ, Sohn HY. 2005. Screening of antibacterial agent against *Streptococcus mutans* from natural and medicinal plants. *J Life Sci* 15:715-725
- Korea Food & Drug Administration [KFDA]. 2016. Status of Functional Ingredients for Health Functional Foods in Korea. pp.18-25, 71-72
- Korea Food & Drug Administration [KFDA]. 2017. Production of Health Functional Foods. pp.47-53
- Korea Health Supplement Association [KHSa]. 2017. 2017 Health Functional Food Market Status and Consumer Survey Report
- Lee CH, Youn Y, Song GS, Kim YS. 2011. Immunostimulatory effects of traditional *Doenjang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:1227-1234
- Lee DG, Chang YS, Park YK, Hahm KS, Woo ER. 2002. Antimicrobial effects of oocitillone isolated from stem bark of *Ailanthus altissima*. *J Microbiol Biotechnol* 12:854-857

- Lee HC. 2015. Immunomodulatory activity of the lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. Master's Thesis, Jeonbuk Univ. Jeonju. Korea
- Lee IH, Lee SH, Lee IS, Park YK, Chung DK, Choue RW. 2008. Effects of probiotic extracts of *Kimchi* on immune function in NC/Nga mice. *Korean J Food Sci Technol* 40: 82-87
- Lee YS, Choi JB, Joo EY, Kim NW. 2007. Antioxidative activities and tyrosinase inhibition of water extracts from *Ailanthus altissima*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:1113-1119
- Lee YS. 2007a. Physiological activities of ethanol extracts from different parts of *Ailanthus altissima*. *J Korean So Food Sci Nutr* 36:389-394
- Lee YS. 2007b. Physiological activities of hot water extract from *Ailanthus altissima*. *Korean J Food Preserv* 14:170-176
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
- Noh GM. 2015. Development of Food for Immune Enhancement through Mixture of Growth-Stimulatory Plant of Lactic Acid Bacteria with High Immune Activity. Rural Development Administration
- Park HS, Lee SH, Uhm TB. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27:433-440
- Rangavajhyala N, Shahani KM, Sridevi G, Srikumaran S. 1997. Nonlipopolysaccharide component(s) of *Lactobacillus acidophilus* stimulate(s) the production of interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α by murine macrophages. *Nutr Cancer* 28:130-134
- Seo SJ, Park GE, Jang MJ, Lee YS. 2018. Anti-aging effects of ailanthi radicis cortex extract. *J Investig Cosmetol* 14:179-186
- Xie C, Kang J, Burris R, Ferguson ME, Schauss AG, Nagarajan S, Wu X. 2011. Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis* 216:327-333
- Yoon JA, Shin KO. 2018. Student on the biobical activity of synbiotics: A review. *Korean J food Nutr* 31:319-327
- Yoshitaka H, Shinji M, Yoshihiro Y, Yasunobu Y, Tomomi T. 2006. Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 augments acquired immunity in healthy adults. *J Nutr* 136:3069-3073
- Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. 2005. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 135:1752-1756

Received 24 Novebmer, 2018

Revised 06 December, 2018

Accepted 13 December, 2018