KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 50, No. 4, pp. 444~450 (2018)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2018.50.4.444

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

꿀벌 꽃가루 열수 추출물의 수지상 세포 활성화 및 Th1 반응에 미치는 효과

조은지[1] · 김이은[1] · 변의홍[1,2,*]
[1]공주대학교 식품공학과, [2]공주대학교 식품과학연구소

Effect of bee pollen extract on activation of dendritic cells and induction of Th1 immune response

Eun-Ji Cho[1], Yi-Eun Kim[1], and Eui-Hong Byun[1,2,*]
[1]*Department of Food Science and Technology, Kongju National University*
[2]*Food Science Research Institute, Kongju National University*

Abstract Dendritic cells (DCs) are potent antigen-presenting cells that play a pivotal role in modulating both innate and adaptive immunity. This study examined the immunomodulatory activities of hot-water extracts of bee pollen (BPW) in bone-marrow derived DCs (BMDC) and mice splenocytes. BMDCs isolated from mice were treated with 250 and 500 μg/mL BPW for 24 h. BPW, up to 500 μg/mL, did not display any cellular toxicity against BMDCs. In fact, it functionally induced BMDC activation via augmentation of CD80, CD86, and major histocompatibility complex (MHC) class I/II expression and pro-inflammatory cytokine (tumor necrosis factor; TNF-α, interleukin; IL-6, and IL-1β) production. Interestingly, BPW treatment significantly increased the production of interferon (IFN)-γ in splenocytes, suggesting its possible contribution to Th1 polarization in immune response. Taken together, these findings suggest that BPW may regulate innate and adaptive immunity via DC activation and Th1 polarization in immune responses.

Keywords: bee pollen, dendritic cells, splenocyte, immunomodulatory activity, cytokine production

서 론

생체의 면역계는 각종 이물질과 병원체의 침입으로부터 자기를 보호하기 위하여 면역기능에 관여하는 림프구와 보조세포, 그리고 이들이 모여서 만들어진 림프조직으로 구성되어 있다. 면역반응은 항원에 대한 특이성에 따라 선천 면역과 후천 면역 반응으로 구분할 수 있다. 선천 면역은 병원체나 조직의 손상을 빠르게 인식하여 후천 면역에 관여하는 세포에 위험을 알리는 신호를 보내는 능력을 지니고 있으며 항원특이적인 반응을 수반하지 않는다. 후천 면역은 T 세포와 B 세포에 의해 이루어지고 항원을 재인식하여 효과적으로 대처하는 능력을 지니고 있으며, 항원을 제시해 주는 세포에 의해 면역 반응이 개시되며 면역반응의 세기가 선천 면역에 비하여 매우 큰 특징을 가지고 있다(Chung 등, 1984; Ryu, 2003).

수지상 세포(dendritic cells)는 항원을 접한 적이 없는 자연 T 세포를 자극하여 획득면역반응을 유도하는 능력이 있는 유일한 면역세포이다. 수지상 세포는 조혈모세포에서 분화하는 것으로 생각되고 있으며, 항원을 받아들여 표면에 제시하는 능력이 뛰어난 것으로 알려져 있다(Li 등, 2009). 또한 림프구를 활성화 시키는데 관여하는 다양한 공동 자극분자(co-stimulatory molecular)들이나 세포간의 접촉에 관여하는 여러 종류의 부착분자를 표면에 많이 발현하고 있어 다른 면역세포들과 구분하여 전문적 항원제시세포(professional antigen presenting cell)라고 한다(Todd과 Bretherick, 1942). 특이적 면역 반응은 T 세포에 의존적 면역반응으로 항원제시 세포가 MHC 분자에 결합한 항원 펩타이드를 제시하는 것으로 시작한다. 특이적 면역반응을 유도하는 과정에서 중요한 역할을 하는 항원제시세포를 전문적 항원제시세포라고 하며 B 세포, 큰포식세포, 수지상세포가 존재한다. 불활성화 상태의 B 세포는 탐식작용이 활발하지 않고 MHC 분자의 발현양도 거의 존재하지 않으며, 큰포식세포의 경우 탐식작용은 활발하지만 면역작용의 결과 생산되는 IFN-γ와 같은 사이토카인의 도움이 없으면 MHC 분자를 발현하지 못하기 때문에 항원을 제시할 수 없다. 그러나 수지상 세포는 생체 내에 널리 분포하고 있으며 성숙하는 과정에서 다양한 면역반응을 조절하는 강력한 전문 항원제시 세포로 알려져 있다(Andrade 등, 1997; Choi 등, 2007).

꿀벌 꽃가루(bee pollen)는 일벌이 어린 벌에게 먹이기 위해서 다리에 묻혀오는 꽃가루에 꿀과 효소가 혼합되어 경단처럼 뭉쳐진 덩어리로 일반 꽃가루보다 영양성분이 풍부하여 오래전부터 자연 건강식품으로 알려져 있다(Clerici과 Shearer, 1994). 꽃가루는 꿀벌 유충과 성충의 단백질원으로 탄수화물, 지방질, 바이타민, 무기질 등의 영양성분이 풍부하다. 특히 벌이 채취한 꽃가루는 꿀과 효소가 혼합되어 있어 꽃가루보다 영양성분이 풍부하여 꿀벌의 단백질과 로열젤리의 원료로 이용된다(Canon, 2000). 꽃가루는 페놀성 화합물, 플라보노이드, 안토사이아닌과 타닌과 같은 생리활성 물질을 포함하고 있다. 식물에서 직접 수집한 꽃가루 기능에 대한 연구는 많이 보고되었지만, 꿀벌 꽃가루의 기능

*Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Republic of Korea.
Tel: +82-41-330-1481
Fax: +82-41-330-1489
E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr
Received May 16, 2018; revised July 2, 2018;
accepted July 11, 2018

에 대한 연구는 미비한 실정이다. 꿀벌 꽃가루는 골량을 증가시켜 뼈영성증을 예방하고, 산화방지와 라디칼 제거 활성, 위장보호 등 다양한 병에 효과가 있다고 알려져 있다. 최근에는 항염증 작용을 나타내는 성분은 밝혀지지 않았지만 남성의 전립선염에 미치는 영향과 동물실험에서 항염증 효과가 연구되었다(Banchereau과 Steinman, 1998; Jin 등, 2018; Kim 등, 2015; Maruyama 등, 2010, Shin 등, 2006). 현재 꿀벌 꽃가루에 대한 연구는 항균 및 전립선염에 관한 연구에만 치우쳐져 있고, 그 밖의 생리활성에 관한 연구들은 아직 미비한 실정이다.

본 연구는 비폴렌의 면역활성능에 관하여 알아보기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 수지상세포에 꿀벌 꽃가루(bee pollen)을 처리하여 세포생존율, 면역조절 물질인 산화질소, 염증 유발 사이토카인 분비능, 세포표면 활성인자(CD80/86, MHC class I, II)들의 발현 등에 미치는 영향에 관하여 알아보았다.

재료 및 방법

벌꿀꽃가루의 제조

본 연구에서 사용된 벌꿀꽃가루는 생생드림(Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였으며, 추출조건은 다음과 같다. 건조된 벌꿀꽃가루을 실험실용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여, 벌꿀꽃가루 50 g에 400 mL의 distilled water (DW)를 가하여 100°C에서 2시간 동안 열수추출 하였다. 추출물을 filter paper (No. 4, Whatman, Kent, UK)로 여과 후, 원심분리(3,200 rpm, 20 min)하여 상층액을 취하였고 동일한 방법으로 2회 반복 하였다. 반복 추출하여 얻은 추출 상층액을 냉동 건조하여 –70°C에서 보관하여 본 실험에 사용하였다.

내독소 함량 평가

열수추출물의 내독소 함량은 limulus amebocyte lysate assay kit (GenScript, Piscataway, NJ, USA)을 구입하여 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 내독소 함량은 15 pg/mL (0.1 EU/mL) 이하로 측정되었다.

실험동물

실험동물은 6주령(18-20 g)의 C57BL/6 수컷 마우스를 Orient사(Seongnam, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 분양받은 마우스는 동물 사육실 내부 환경에서 1주간 순화시킨 후 미분화 골수세포를 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 인산완충식염수(phosphate buffered saline; PBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)로 3회 세척한 후 적혈구를 제거하기 위하여 적혈구(red blood cell; RBC) 용해완충용액 (Invitrogen Co.)를 5 mL 처리하여 10분간 방치하였다. 인산완충식염수로 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) 1640배지(Invitrogen Co.)에 2 mM 엘글루타민, 100 unit/mL 페니실린(penicillin) 스트렙토마이신(streptomycin), 50 μM 머캅토에탄올(mercaptoethanol), 0.1 mM 비필수아미노산(non-essential amino acid), 1 mM 피루브산소듐, 20 ng/mL 과립구큰포식세포집락자극인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, M-CSF, R&D System, Minneapolis, MN, USA), 20 ng/mL IL-4 (R&D System)를 첨가하여 8일 동안 배양했다.

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% CO_2 배양기(incubator)에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시고 BPW를 인산완충용액(WelGene, Daegu, Korea)에 용해하여 250 및 500 μg/mL의 농도로 처리하였다. 또한, 음성대조구로는 샘플 대신에 동량의 인산완충용액을 처리하였고, 양성대조구로 지방질다당류(lipopolysaccharide; LPS)를 200 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후 well당 30 μL의 3-[4,5-dimethylthia zol-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. MTT 시약의 첨가로 형성된 포마잔(formazan)을 녹이기 위해서 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO, Sigma-Aldrich, Co.)를 100 μL씩 첨가하고 1시간 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader, BioTek, Winooski, VT, USA)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, BPW를 250과 500 μg/mL의 농도로 처리하였고, 양성대조구인 지방질다당류를 200 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후, 분리된 배양 상층액에서 사이토카인(TNF-α, IL-6 및 IL-1β)의 함량을 측정하였다. 사이토카인의 함량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정 하였으며, 이때 사이토카인의 농도는 키트에 포함되어 있는 표준 용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

산화질소(II) (nitric oxide) 유도능 평가

분리된 배양 상층액 100 μL에 동량의 Griess (Sigma-Aldrich, Co.) 시약을 처리하여 10분 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화질소(II)의 농도는 아질산소듐($NaNO_2$, 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, BPW를 250과 500 μg/mL의 농도로 처리하였고, 양성대조구인 지방질다당류를 200 ng/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후 다양한 농도로 BPW를 처리한 각각의 세포를 회수하였다. 항체의 비 특이적인 결합을 방지하기 위하여 회수된 각각의 세포에 1 μg/mL의 Fcγ 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.

지라 세포 분리

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

지라 세포의 세포 증식능 평가

96 well plate에 well당 1×10^6개의 지라 세포를 분주한 후, BPW를 250 및 500 μg/mL과 양성 대조구인 Con A를 1 μg/mL의 농도로 처리하였고, 37°C로 유지되는 5% CO_2 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, WST-1 (Daeil Lap Science, Seoul, Korea) 용액을 각 각의 well에 10 μL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 증식능을 평가하였다. 지라 세포의 증식능은 다음 식에 의하여 계산되었다.

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

지라 세포의 대한 사이토카인 분비능 평가

지라 조직으로부터 분리된 비장세포를 48 well plate에 well당 2×10^6 개씩 분주한 후 BPW를 250 및 500 μg/mL의 농도로 처리하였고, 또한 양성 대조구인 ConA를 1 μg/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배양 상등액에 존재하는 사이토카인(IL-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 일원배치분산분석으로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 던컨 시험으로 $p<0.05$, 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

BPW 처리에 따른 수지상세포의 생존율 평가

BPW의 처리가 수지상세포의 세포 증식능에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 C57BL/6 마우스로부터 미분화 골수 세포를 분리하여 수지상 세포로 분화시킨 후, 분화된 수지상 세포에 음성대조구로는 BPW 대신 동량의 인산완충용액을 처리하였고, 양성 대조구로는 수지상세포의 유사분열촉진제(mitogen)인 지방질 다당류를 200 ng/mL로 처리하였으며, BPW를 250 및 500 μg/mL의 농도로 처리하여 수지상 세포 생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). 수지상세포에서 BPW를 250과 500 μg/mL의 농도로 처리(n=4)하였을 때, 세포 생존율이 각각 105.05±1.14, 107.84±0.45%로 관찰되었으며, 이는 음성대조구(CON)와 비교하였을 때 BPW 처리는 세포를 사멸시키지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 BPW의 처리는 수지상 세포에 대한 세포 독성을 일으키지 않는 것으로 판단된다. 본 연구에서 사용된 지방질다당류는 큰포식세포와 수지상세포의 유사분열 촉진제로, 지방질다당류 처리 시 면역을 매개하는 다양한 면역관련 인자의 분비를 증가시켜, 미지의 시료에 대한 면역활성능 평가 시 양성대조구로서 면역 활성을 비교하는데 주로 사용된다(Kim 등, 2015b). 수지상세포의 활성조절을 하는 것은 면역관련 질병들의 예방과 치료에 관한 무한한 가능성을 제시할 수 있다. 따라서 본 연구에서도 BPW의 처리는 수지상세포의 세포독성에 영향을 미치지 않았으며, 추후 BPW 처리에 따른 면역 활성을 평가하기 위하여 수지상세포의 사이토카인과 산화질소(II)의 분비능에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다.

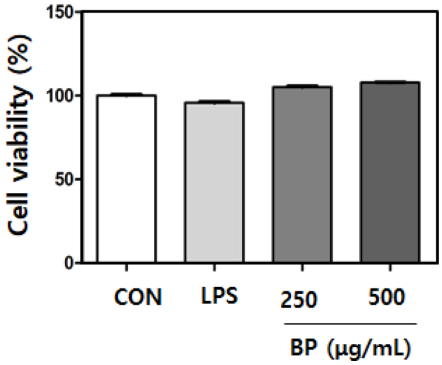

Fig. 1. Cell viability test of bee pollen (BPW) in bone-marrow derived dendritic cell. BPW was treated at the concentration of 250 and 500 μg/mL, and lipopolysaccharide (LPS) was treated at the concentration of 0.2 μg/mL as a positive control. Cell viability was conducted in triplicates (n=4), and the results are expressed as mean±SD.

BPW 처리가 수지상 세포의 산화질소 분비능에 미치는 영향

비특이적 항원의 침입에 의해 활성화된 대식세포는 항원을 포식하고, 항원에 대한 정보를 후천면역반응에 전달하여, 세포 매개성 면역반응의 활성을 유도한다. 활성화된 수지상세포가 분비하는 산화질소(II)는 아르기닌으로부터 iNOS에 의해 생성되며, 생체 내 감염을 일으키는 항원을 효과적으로 제어하기 위한 수단으로 사용된다(Lee 등, 2006). 따라서 면역반응의 증감을 판단하기 위하여 NO 분비능의 증가는 수지상세포의 활성화에 관한 바이오마커로 주로 사용된다(Gao 등, 2000). 비교적 낮은 농도의 NO의 분비는 면역세포 내의 면역 활성 유도 및 유지하는 중요한 수단인 nuclear factor (NF)-κB를 활성화 시키고 면역 작용을 활발하게 유도 시켜 면역 조절자로 인식된다고 보고된다(Wink 등, 2011).

BPW의 처리가 수지상세포 활성화에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여, 수지상 세포에 BPW를 처리한 후 세포 상층액에서 산화질소(II) 분비능에 관하여 알아보았다(Fig. 2). 양성 대조군인 지방질 다당류를 처리하여 산화질소(II) 분비능(n=4)이 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 세포 독성에 영향을 미치지 않는 농도인 250과 500 μg/mL로 BPW를 처리하여 NO의 분비능을 관찰한 결과, BPW를 처리하였을 경우, 농도 의존적으로 산화질소(II)의 분비능을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 그러나 수지상세포의 양성대조군인 지방질 다당류의 처리구와 비교할 때 상대적으로 낮은 것으로 보아 BPW의 처리는 면역 조절인자로서 산화질소(II)의 분비능을 유의적으로 증가시키는 것으로 사료되며, 보다 면밀한 분석을 위하여 BPW의 사이토카인 분비능에 관하여 관찰하였다.

BPW 처리가 수지상 세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향

수지상 세포와 같은 포식세포들이 외부 자극에 의해 활성화 되

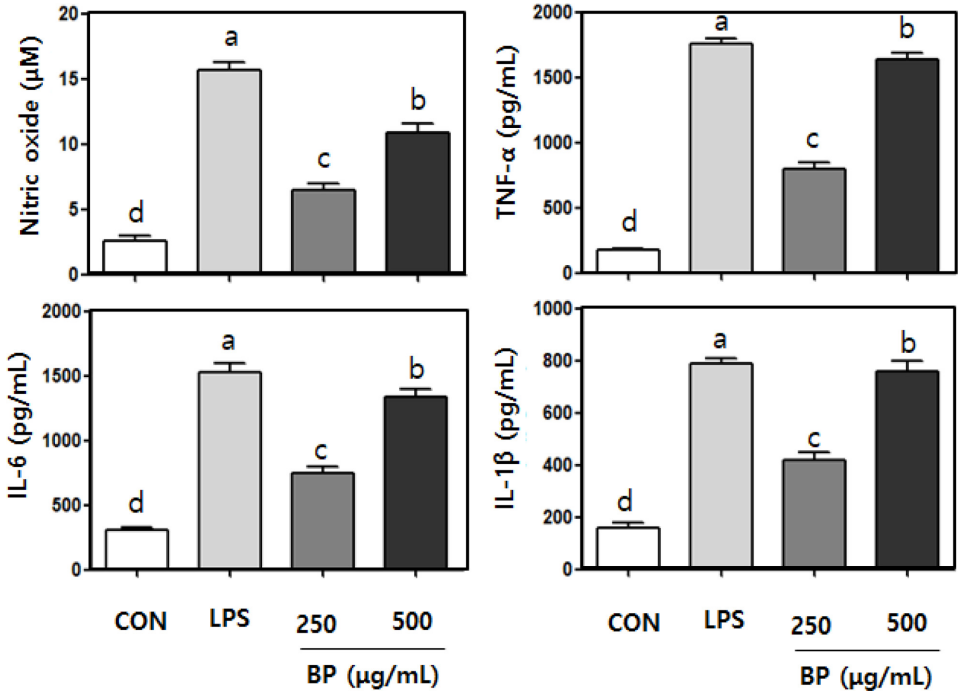

Fig. 2. Nitric oxide (NO) production activity and cytokine (TNF-α, IL-6, and IL-1β) productions activity of bee pollen (BPW) in bone-marrow derived dendritic cell. BPW was treated at the concentration of 250 and 500 μg/mL. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2 μg/mL. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit (n=4). [a,b,c,d]Values with different letters are significantly different (p<0.05).

면 부착성이 강해지며, 외부 바이러스나 세균에 오염된 세포를 직접적으로 탐식하여 사멸시키거나 간접적으로 면역력을 활성화시키는 사이토카인이라는 물질을 생성한다(Lee 등, 2012). 사이토카인은 면역의 연결자로서 외부 항원에 대한 여러 면역세포 간의 협력을 조절하며 다양한 자극에 대하여 한 개체의 세포와 조직들이 유기적으로 작용할 수 있도록 도와줄 뿐만 아니라 이들의 생성과 분비는 면역반응의 조절에 있어서 매우 중요한 역할을 수행한다. 수지상 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인에는 TNF-α, IL-6과 IL-1β 등이 있으며, 이들은 수지상세포의 활성화 지표로서 다양한 물질의 면역 활성을 판단하는 척도로 여겨진다(Calixto 등, 2004). 종양 괴사 인자로 알려져 있는 TNF-α는 수지상세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로 큰포식세포의 활성화에 기인하고 종양세포에 대학 강력한 세포독성을 나타내기도 하지만 외부 항원에 오염된 세포의 살해능력을 증가시켜 숙주의 감여부위를 국소화 시켜 초기 면역반응에 중요한 역할을 수행한다(Kim 등, 2004). IL-6는 면역반응, 조혈작용과 염증을 조절하는 사이토카인으로 형질세포 분화를 유도하여 B 세포, T 세포의 분화를 촉진시키거나 그 기능을 조절하여 면역글로불린의 합성에 관여하고 다른 사이토카인과 협력하여 상승작용을 나타내거나 그 기능을 조절하여 외부병원성 항원의 침입에 따른 염증을 억제시키는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Byun, 2015). IL-1β는 TNF-α와 유사하게 초기 면역반응에 관여하여 감염부위를 최소화 시키고, 큰포식세포의 포식 작용, 미생물사멸과 B 세포와 T 세포의 분화를 촉진시켜 후천면역반응의 개시반응을 빠르게 유도하는 역할을 수행한다(Cho 등, 2017). 또한 이러한 사이토카인들은 직접적으로 선천면역계를 활성화 시킬 뿐만 아니라 간접적으로 T 세포 관련 후천 면역계를 자극시켜 숙주의 면역반응에 중대한 촉매로서의 역할을 수행한다고 보고되었다(Ryu 등, 2006). 따라서 본 연구에서도 BPW의 처리가 수지상세포의 사이토카인에 미치는 영향을 평가하기 위하여 수지상 세포에 BPW를 농도별(250과 500 μg/mL)로 처리하여 배양 상층액에 존재하는 사이토카인의 함량을 ELISA법을 이용하여 측정하였다(Fig. 2).

양성대조구인 LPS 처리 시 모든 처리구에서 사이토카인(n=4)의 분비량이 증가하는 것으로 관찰되었다. 농도별(250과 500 μg/mL) BPW의 처리구에서 TNF-α, IL-6과 IL-1β의 분비량은 농도의존적으로 사이토카인의 분비량이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 보아 BPW의 처리는 수지상세포의 산화질소(II) 분비 유도능을 증가시키는 결과와 유사하게 사이토카인 유도능 또한 증가하는 것으로 관찰되어 수지상세포의 면역 활성에 기여하는 것으로 판단된다.

BPW 처리가 수지상세포의 세포 표면 활성 인자에 미치는 영향

수지상 세포는 항원을 섭취하여 T 세포에 항원을 제시함으로서 세포의 증식을 유도한다. 수지상 세포가 T 세포를 활성화 시키는 것은 크게 두 가지 신호로 나눌 수 있다. 먼저 수지상세포가 섭취한 항원을 분해하여 자신이 가지고 있는 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex: MHC) 라고 하는 분자에 항원 펩타이드를 결합시켜 T 세포 항원 수용체를 자극하는 신호가 있다. 또한 수지상 세포의 세포 표면 활성인자(cell surface activation marker)인 분자는 세포 표면에 부착된 단백질 분자로 T 세포 표면 단백질 분자를 자극하는 신호로 나눌 수 있다. 다양한 면역 세포구들은 세포표면에 가지고 있는 표면 분자 구조에 따라 서로를 구분하며 이러한 구분은 분화군이라는 표현형을 사용한다. 이러한 표현형인 CD는 같은 종류의 세포를 분리하거나 분석하는 연구에도 매우 유용하게 사용되며, 세포의 활성화와 관련하여 중요한 지표로 사용된다(Lee 등, 2001; Piani 등, 2000). CD80과 CD86은 수지상세포의 활성화를 나타내는 지표로서 이러한 분자의 발현이 증가하게 되면 항원제시능력이 증가하며, T

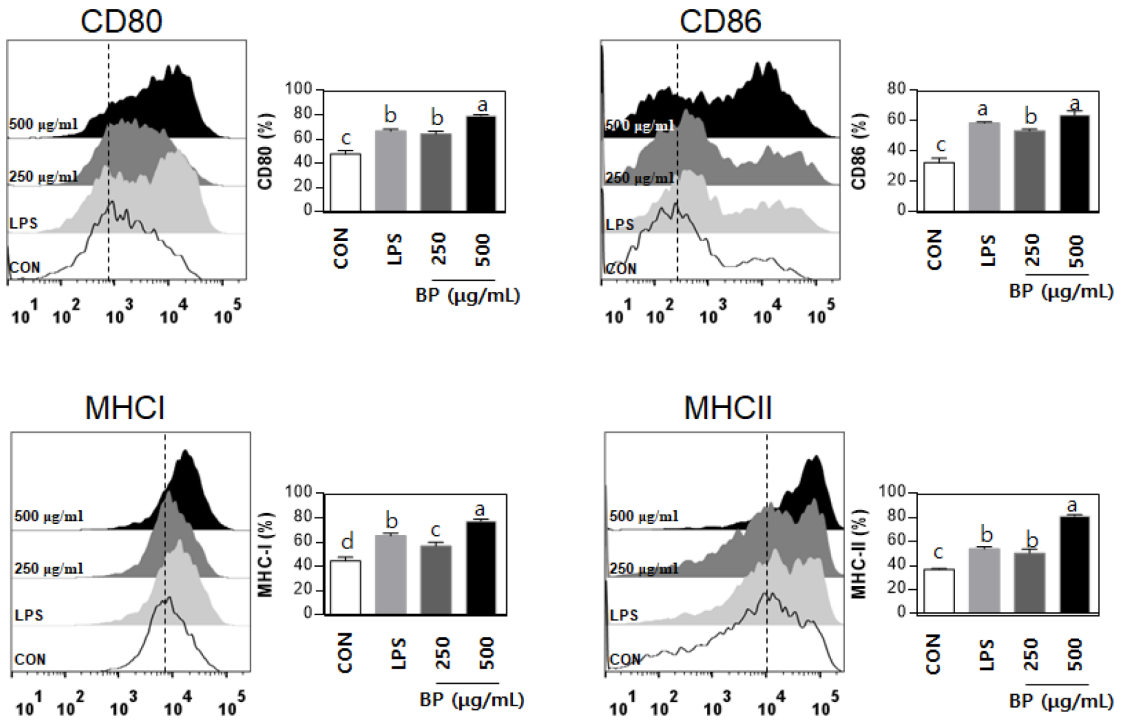

Fig. 3. Cell surface marker (CD80/86 and MHC class I/II) expression levels of bee pollen (BPW) in bone-marrow derived dendritic cell. BPW was treated at the concentration of 250 and 500 μg/mL. Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2 μg/mL. After 24 h, cell surface marker expression was measured by flow cytometer using specific antibody (n=4). [a,b,c,d]Values with different letters are significantly different (p<0.05).

세포와의 세포 간 상호작용(cell to cell interaction)을 돕는 역할을 수행하므로 CD80과 CD86의 발현 증가는 수지상세포의 활성화와 매우 밀접한 관련이 있다(Mo 등, 2017). 본 연구에서는 수지상세포가 활성화 되었을 때 가지는 표현형인 CD80과 CD86의 발현에 관하여 유세포분석기를 통하여 분석하였다(Fig. 3). BPW를 농도별(250 및 500 μg/mL)로 처리하였을 때 수지상 세포의 표면 활성 인자인 CD80과 CD86의 발현이 더욱 증가된 것을 관찰할 수 있었다.

또한 선천면역을 담당하는 탐식세포가 병원체를 탐식하게 되면 후천 면역을 담당하는 T 세포에게 병원체의 항원을 제시하게 되는데 이 과정에서 직접적으로 항원을 제시 할 수 없고 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)가 세포 표면에 발현하는 단백질에 항원을 결합시켜 전달한다. 주조직적합성 복합체는 MHC I과 II가 존재하며 활성화되지 않았을 때에는 세포 표면에 적은 양이 발현되지만 활성화되면 발현되는 양이 증가하여 T 세포에 많은 양의 항원을 전달할 수 있으며, T 세포를 직접적으로 활성화 시켜 후천 면역반응을 활발히 진행시킨다(Piani 등, 2000). 따라서 본 연구에서 BPW의 처리하였을 때 수지상세포의 세포표면 활성인자인 MHC class I과 II발현에 관하여 관찰한 결과 유의적으로 MHC class I과 II 발현이 BPW의 처리는 농도 의존적으로 세포 표면 활성인자들의 발현을 증가시키는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 이러한 결과로 미루어보아 BPW의 처리는 수지상 세포의 세포 표면 활성 인자들을 직접적으로 증가시켜 면역세포를 활성화 시키는 것으로 사료된다.

BPW 처리가 지라 세포의 생존율에 미치는 영향

체내에서 지라는 중요한 면역기관으로서 혈액에서부터 유래되는 외래항원에 대하여 주된 보호 면역을 수행하는 장기로 B와 T

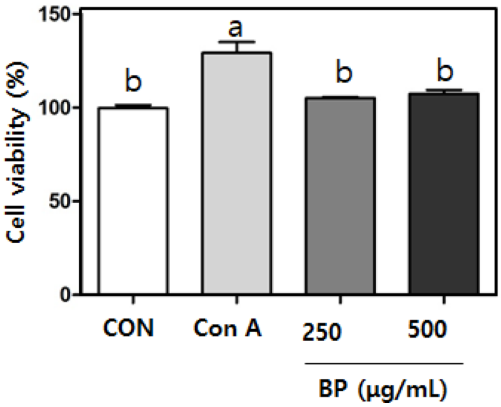

Fig. 4. Cell viability test of bee pollen (BPW) in splenocyte separated from mouse spleen. BPW was treated at the concentration of 250 and 500 μg/mL, and concanavalin A (ConA) was treated at the concentration of 1 μg/mL as a positive control. After 24 h, splenocyte viability was evaluated by WST-1 assay (n=4). [a,b]Values with different letters are significantly different (p<0.05).

림프구의 성숙과 분화가 이루어지는 림프기관으로 이러한 림프구의 분화는 면역에서 매우 중요한 의미를 갖게 된다(Mo 등, 2017). 지라에는 다양한 면역세포들이 존재하는데, 주로 T 세포가 60% 이상을 차지하며, 나머지는 B 세포와 탐식세포들이 차지한다. 특히 지라 세포는 면역반응과 밀접한 관련이 있으며, 그 크기나 수가 대표적인 면역 지표로 이용될 수 있다(Shan 등, 1999). 본 실험에서도 수지상세포를 대상으로 BPW가 선천면역계의 면역활성능을 유도한다는 것을 증명할 수 있었고, 후천면역계

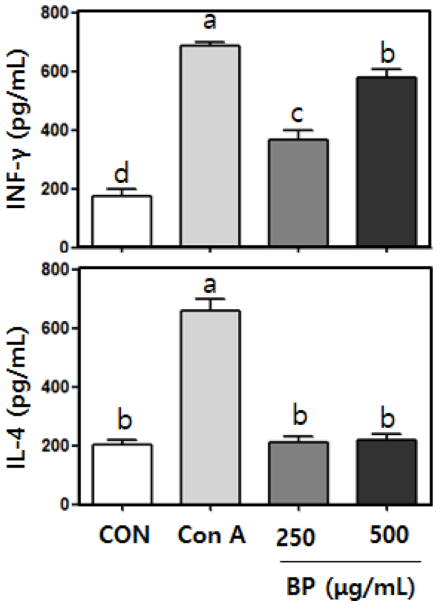

Fig. 5. Cytokine (IFN-γ and IL-4) productions activity of bee pollen (BPW) in splenocyte separated from mouse spleen. BPW was treated at the concentration of 250 and 500 μg/mL, and concanavalin A (ConA) was treated at the concentration of 1 μg/mL. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit (n=4). [a,b,c,d]Values with different letters are significantly different (p<0.05).

를 담당하는 T 세포에 대한 BPW의 면역 활성 유도능에 관하여 알아보기 위하여 마우스로부터 지라를 무균적으로 적출하고, 적출된 지라로부터 지라세포를 분리한 후 BPW를 처리하여 지라 세포의 세포 증식능에 미치는 영향에 관하여 평가하였다(Fig 4).

BPW를 지라 세포에 농도별(250과 500 μg/mL)로 처리결과, BPW 처리구에서 세포독성에 영향을 미치지 않고 지라 세포의 증식능이 증가되는 것을 확인하였다. 따라서 BPW는 상기 제시된 농도에서 지라 세포에 독성을 미치지 않는 것으로 사료되며 보다 면밀한 실험을 위하여 지라 세포에 다수 포함되어 있는 면역 T 세포가 분비하는 사이토카인에 관하여 Th1과 Th2로 나누어 평가하였다.

BPW 처리가 지라 세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향

지라 세포가 활성화되면 여러 종류의 면역반응을 매개하는 사이토카인을 분비하게 된다. 지라 세포에서 분비되는 대표적인 사이토카인은 IL-2, 3, 4, 5, 6, 10, 13과 IFN-γ 및 TNF-α 등이 있다. 이들 중 IFN-γ는 병원성 미생물 침입에 대항하여 숙주를 보호할 수 있는 세포활성물질로 세포 매개 면역반응에서 중요한 역할을 하며 비장세포 면역활성 여부를 판단하는 중요한 지표로 알려져 있다(Ryu 등, 2006). 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(Lee 등, 2003). Th1 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인은 IL-12, IFN-γ, TNF-α가 있으며, Th2 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로는 IL-4, 5, 10, 13이 있다. 특히 Th1 세포가 분비하는 사이토카인은 면역 활성과 관련이 있으며, Th2 세포가 분비하는 사이토카인은 알레르기, 아토피 질환과 염증 유발과 상관관계가 있다고 보고되었다(Medzhitov, 2001). 본 연구에서도 BPW의 처리가 지라 세포의 사이토카인 분비 특성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 Th1 세포가 분비하는 IFN-γ와 Th2 세포가 분비하는 IL-4의 분비능에 관하여 측정하였다(Fig. 5).

BPW를 농도별(250과 500 μg/mL)로 처리한 결과 Th1 세포가 분비하는 사이토카인 IFN-γ는 유의적으로 증가하였으며, 대조적으로 Th2 세포가 분비하는 사이토카인 IL-4의 분비량에 대한 변화는 측정되지 않았다. 본 연구에서 양성대조군으로 사용된 Con A의 경우 T 세포의 대표적인 유사분열촉진제로서 Th1/Th2 세포가 분비하는 모든 종류의 사이토카인 분비를 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Chen 등, 2009). 이러한 결과로 미루어 보아 BPW의 처리는 알레르기와 아토피와 같은 염증성 질환 유발과 밀접한 관련이 있는 Th2 세포의 활성화에는 영향을 주지 않으며, 면역 활성과 밀접한 관련이 있는 Th1 세포의 활성화를 일으켜 면역학적 상승 작용이 나타내는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 꿀벌 꽃가루 추출물(BPW)의 면역 활성에 관하여 알아보기 위하여, 선천면역계의 대표적인 수지상세포와 후천면역계의 대표적인 비장세포에 BPW를 처리 하여 면역세포의 활성능을 관찰하였다. 수지상 세포에 BPW를 처리하여 세포 생존율, 산화질소(II)와 사이토카인(TNF-α, IL-6과 IL-1β) 분비능과 세포 표면분자를 관찰 하였다. 세포 생존율은 수지상 세포에 BPW를 처리하였을 때, 세포 독성을 일으키지 않았으며 주요 면역 활성 인자인 산화질소(II) 분비능을 관찰한 결과, 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한 사이토카인의 분비능을 관찰한 결과, TNF-α, IL-6과 IL-1β의 함량이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한 활성화된 면역세포의 세포 표면에서 발현되는 CD80과 CD86의 발현과 항원제시에 밀접한 관련이 있는 MHC class I, II의 발현이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한 후천면역에서 중요한 역할을 수행하는 면역 T 세포가 다량 분포하는 지라 세포를 분리하여 BPW를 처리 하였을 때 Th1 세포가 분비하는 사이토카인의 함량이 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 BPW는 선천면역뿐만 아니라 후천면역에 관여하는 다양한 면역세포의 활성화에 직간접적으로 관여하는 것으로 사료된다.

References

Andrade P, Ferreres F, Gil MI, Toms-Barbern FA. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. Food Chem. 60: 79-84 (1997)

Banchereau J. Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392: 245-252 (1998)

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)

Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Planta Med. 70: 93-103 (2004)

Cannon JG. Inflammatory cytokines in nonpathological states. News Physiol Sci. 15: 298-303 (2000)

Chen FY, Ye YP, Sun HX, Li HX, Shi H. Stemucronatoside L, a pregnane glycoside from the roots of Stephanotis mucronata, inhibits Th1/Th2 immune responses in vitro. Chem. Biodivers. 6: 916-923 (2009)

Cho EJ, Lee JH, Sung NY, Byun EH. Anti-inflammatory effect of Annona muricata Leaves Ethanol extracts. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 46: 681-687 (2017)

Choi JH, Yim GY, Jang SY, Jeong YJ. Inhibition effect of the harmful food-born microorganisms on germination condition of acorn pollen. Korean J. Food Preserv. 14: 87-93 (2007)
Chung YG, Yoon SH, Kwon JS, Bae MJ. Nutritional and biochemical studies on the pollen loads studies on lipid compositions of sunflower pollen load and effects of its pollen load on liver cholesterol metabolism in mouse. J. Kor. Soc. Food Nutr. 13: 169-174 (1984)
Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. Immunol. Today 15: 575-581 (1994)
Gao X, Bjork L, Trajkovski V, Uggla M. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. J. Sci. Food Agr. 80: 2021-2027 (2000)
Jin TY, Saravanakumar K, Wang MH. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen. Biocatal. Agric. Biotechnol. 13: 186-189 (2018)
Kim MJ, Bae NY, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Cho YJ, Ahn DH. The anti-inflammatory effect of skipjack tuna (Katsuwonus pelamis) oil in LPS-induced RAW 264.7 cells and mouse models. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 30: 326-331 (2015a)
Kim SB, Jo YH, Liu Q, Ahn JH, Hong IP, Han SM, Hwang BY, Lee MK. Optimization of extraction condition of bee pollen using response surface amethodology: Correlation between anti-melanogenesis, antioxidant activity, and phenolic content. Molecules. 20: 19764-19774 (2015b)
Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. FEBS. Lett. 569: 321-326 (2004)
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)
Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, Kim K, Han SS, Lee CK. Acemannan purified from Aloevera induces phenotypic and funtional maturation of immature dendritic cells. Int Immunopharmacol. 1: 1275-1284 (2001)
Lee TS, Shim SM, Im KH, Kim JW, Lee UY, Shim MJ, Lee MW. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects crude polysaccharides extracted from Paecilomyces sinclairii. Kor. J. Mycol. 31: 155-160 (2003)
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)
Li F, Yuan QP, Rashid F. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from Crataegus pinnatifida Bge. Carbohydr Polym. 78: 80-88 (2009)
Maruyama H, Sakamoto T, Arki Y, Hara H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from Citus sp. spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. BMC Complement Altern. Med. 10: 1472-1483 (2010)
Medzhitov R. Toll-like receptors and immate immunity. Nat. Rev. Immunol 1: 135-145 (2001)
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)
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)
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)
Ryu JB. Classification of honey plants in Korea. Korean J. Apiculture. 18: 5-22 (2003)
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)
Shin SH, Kim DS, Kim SH, Jo SK, Byun MW, Yee ST. Effect of herbal composition (HemoHIM) on the activation of dendritic cells. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 35: 1322-1328 (2006)
Todd FE, Bretherick O. The composition of pollens. J. Econ. Entomol. 35: 312-317 (1942)
Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. J. Leukoc Biol. 89: 873-891 (2011)