

황칠 추출물을 첨가한 청국장이 마우스의 면역기능에 미치는 효과

김진솔¹, 정민주², 정경아³, 송선영⁴, 이현화^{1*}

¹조선대학교 생명과학과, ²동강대학교 보건행정과, ³광주보건대학교 임상병리과, ⁴광주보건대학교 피부미용과

Effect of *Dendropanax morbifera* extract Addition on Chungkukjang on Immune Response of Mice

Jin-Sol Kim¹, Min-Ju Cheong², Kyoung-A Chung³, Seon-Young Song⁴, Hyun-Hwa Lee^{1*}

¹Department of biology, Chosun University

²Department of Health Administration, Dongkang University

³Department of Clinical Pathology, ⁴Department of Skin & Beauty, Kwangju Health University

요약 본 연구는 황칠추출물과 청국장의 기능성 강화를 위해 황칠추출물이 첨가된 청국장의 면역 활성 효능을 검증하고자 실시하였다. 황칠추출물 250, 500, 750 mg/kg 투여군, 청국장 400 mg/kg 투여군, 청국장 400 mg/kg에 황칠추출물 500 mg/kg을 첨가한 투여군으로 나누어 9주간 마우스에 경구 투여 한 후 체중 및 장기무게, 항체 생산 세포 수, 혈청 면역글로불린의 농도를 측정하고 지라의 조직을 검사하였다. 황칠추출물과 황칠추출물을 첨가한 청국장의 투여가 수컷 마우스의 체중과 장기무게에 미치는 영향을 조사한 결과 모든 투여군에서 체중과 각 장기의 무게는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 양적혈구에 대한 항체 생산 세포 수 측정에서는 황칠추출물 250 mg/kg과 500 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 증가하였으며, 림프구는 황칠추출물 500 mg/kg 투여군이 대조군보다 증가하였다. 황칠추출물 500 mg/kg을 첨가한 청국장 400 mg/kg 투여군은 대조군에 비교하여 IgG 수치가 증가하였으며, 지라 조직 검사결과 백색 수질의 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 황칠추출물의 영향으로 황칠 추출물을 첨가한 청국장이 생체 내 면역기능 활성에 효과가 있음을 나타내며 향후 다양한 기능성식품 개발 가능성과 면역증진 식품 소재로 활용될 수 있음을 시사한다.

Abstract This study is to investigate increase immunomodulatory activity of Chungkukjang added with *Dendropanax morbifera* extract. There are four groups divided that Control, *Dendropanax morbifera* extract group, Chungkookjang group and Chungkukjang added to *Dendropanax morbifera* extract group which of five mice each group. Their immunological characteristics were compared with either general Chungkukjang or non treated group in the tested male ICR mice. There were no significant difference in body weight and organ weight. In the plaque forming cell assay, *Dendropanax morbifera* extract 250 and 500 mg/kg groups measured significant increase over the control group. The values of lymphocytes were significantly increased in the *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg group compared with the control group. In the general Chungkukjang 400 mg/kg added with *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg group, total serum immunoglobulin G concentration was significantly higher than the control group and their spleen tissues observed proliferation of white pul. These results demonstrated that Chungkukjang Added with *Dendropanax morbifera* extract was provided enhance of immunomodulatory activity and suggest that it can be used as various functional foods, based on foods promote immune system health.

Keywords : Chungkukjang, *Dendropanax morbifera*, Immunomodulatory Activity, Immunoglobulin, Spleen

본 논문은 2016년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행되었음.

*Corresponding Author : Hyun-Hwa Lee(Chosun Univ.)

Tel: +82-62-230-6653 email: papaya@chosun.ac.kr

Received March 29, 2019

Revised May 2, 2019

Accepted June 7, 2019

Published June 30, 2019

1. 서론

황칠나무(*Dendropanax moribifera*)는 두릅나무과 황칠나무 속에 속하고, 세계적으로 귀한 난지성 상록 활엽수목으로 우리나라에는 1속 1종만 있는 특산 식물로 완도, 해남, 거제도, 제주도 등의 온대 남,서해안 또는 일부 도서지역에만 국소적으로 분포하고 있다[1]. 황칠나무의 주성분으로는 알레르기를 일으키는 sesquiterpene에 속하는 β -selinene가 가장 많고, 다음으로 capnellane-8-one가 함유되어 있으며[2], 외부 자극에 의해 분비되는 항균성 물질인 polyacetylenes계 화합물과 항산화효능을 지니는 페놀, 플라보노이드 계열인 chlorogenic acid, caffeic acid 등이 함유되어 있다[3]. 황칠에 대한 기능성 연구로는 황칠나무 잎 추출물의 항산화, 미백, 항동맥경화 효과 및 항당뇨, 황칠나무 추출물의 간 보호효과, 항암 효과 등이 보고되어 있다[4-7]. 황칠 정유성분의 항고지혈 작용, 황칠액의 진통, 진정, 항경련 효과 등이 보고되었다[8]. 또한 황칠 추출물의 항염증 반응과 면역활성 증진 기능도 보고되고 있으나 주로 황칠 잎 추출물을 MCF7, A549, Hep3B, AGS등의 암세포에 투여하여 IL-6, TNF-alpha와 같은 면역 인자 발현을 통하여 그 기능을 조사하고 있다[9-10]. 황칠추출물의 면역활성 탐색 실험방법이 세포로 한정적이며 동물모델을 통한 면역 활성 효과 실험은 보고되고 있지 않음으로 다양한 실험 방법을 통한 황칠의 면역활성효과를 조사할 필요가 있다.

청국장은 우리나라의 전통 장류 식품 중 하나로 삶은 콩에 고초균을 번식시켜 발효된 식품으로 필수아미노산과 지방산의 함량이 높고 단백질이 풍부한 식품이다[11]. 청국장은 항암활성, 혈전용해, 항산화, 고혈압 예방, 혈중콜레스테롤 저하 및 골다공증 예방 등 다양한 생리활성에 대한 기능이 보고되고 있다[12-16]. 이러한 청국장의 효능을 바탕으로 건강기능성 식품으로의 관심이 증가함에 따라 청국장의 기능성 향상을 위해 복분자, 땅콩 분말, 천일염, 다시마, 양파, 녹차와 썬 등의 여러 가지 천연 식품소재를 첨가한 청국장 연구가 이루어지고 있으며[17-21], 홍삼이나 한약재, 버섯, 표고버섯 등 한약재 추출물을 첨가한 청국장의 특허도 출원되고 있다[22-23]. 그러나 청국장은 특유한 냄새와 장류로써의 제한적인 식품활용에 한계가 있어 젊은 소비자층에 쉽게 선택받지 못하고 있다. 최근에는 섭취가 쉽도록 가루청국장, 청국장환, 말린 청국장 등 다양한 형태의 제품이 연구되고 있으나 청국장 제품의 고품질화와 고기능성을 위해서는 다

양한 제형 개발과 효능 연구가 요구되어진다[24].

황칠과 청국장은 다양한 생리활성 및 약리적 성분을 지니고 있는 것으로 알려져 있지만 동물모델을 이용한 면역활성 증진을 탐색하고 이를 바탕으로한 기능성 식품으로서의 활용은 미비한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 황칠추출물과 황칠추출물을 첨가한 청국장 식이에 따른 마우스의 면역활성 증진 효과를 조사함으로써 황칠추출물과 청국장의 면역증진 식품소재로서의 개발 가능성과 함께 그 이용성을 증대시키고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 시료의 추출

본 실험에 사용된 황칠나무 줄기는 전남 화순 소재의 '전남생약농업조합'으로부터 전라남도 고흥산을 구입하여 식물체 파쇄기(USC, Seoul, Korea)로 파쇄하여 실험에 사용하였다. 황칠 줄기 200 g에 8배량의 증류수 1,600 mL를 가하여 60 °C의 heating mantle(EAM9203-06, M-top, Seoul, Korea)상에서 24시간 추출하였다. 추출액을 Wathman NO.2 여과지로 여과하여 Vacuum evaporator (VV2000, Heidolph, Schwabach, Germany)로 감압 진공 농축한 후 동결건조기(FD8508, Ilshin, Busan, Korea)로 건조하여 총 11.8 g의 분말을 얻어 6 %의 수득율을 얻었다.

청국장은 (주)장흥식품에서 햇콩마루 장흥청국장 분말을 구입하여 사용하였다. 모든 시료는 냉동 보관하며 사용직전 희석하여 사용하였다.

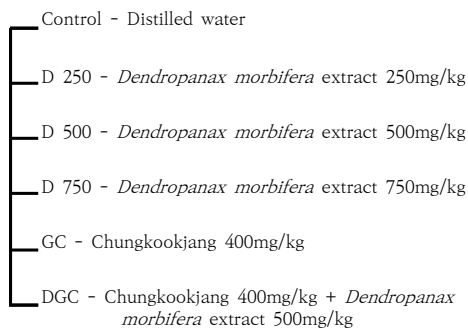
2.2 실험동물

실험동물은 6주령의 체중 30 g의 ICR 수컷 마우스를 다물 사이언스로부터 구입하여 온도 22±2 °C, 습도 55±5 %, 12시간(light-dark cycle)의 환경이 조절되는 실험동물센터에서 식이와 음용수를 제한 없이 공급하면서 일주일간 적응시켜 사용하였다. 이 동물 실험은 조선대학교 동물 실험 윤리 위원회의 승인(승인 번호: CIACUC2017 -S0018)을 받아 동물 윤리 준칙에 의해 진행하였다.

2.3 실험군 설정 및 시료 투여

황칠추출물의 면역활성 증진 효과를 알아보기 위하여 대조군(Control), 황칠추출물 투여군(D), 청국장 투여군

(GC), 황칠추출물을 첨가한 청국장 투여군(DGC)으로 나누어 각 군당 5마리씩 총 30마리를 사용하였다. Control군은 증류수를 경구 투여하였고, D군은 황칠추출물을 예비실험을 통해 선정한 250, 500, 750 mg/kg 농도로 세분하여 각각 경구 투여하였다. GC군은 Lee 등 [22]의 방법을 변용하여 청국장 400 mg/kg을 증류수에 희석하여 경구 투여하였고, DGC군은 청국장 400 mg/kg과 황칠추출물 500 mg/kg을 증류수에 혼합하여 경구 투여하였다. 모든 시료는 증류수에 10 ml/kg의 투여용량으로 희석하여 9주간 경구 투여하였다. 실험군의 분류를 간단히 아래에 요약하였다.



2.4 체중 및 장기무게 측정

모든 실험동물은 시료 투여 전, 투여 시작 후, 실험 종료 시까지 매주 1회 체중을 측정하였다. 실험 종료 24시간 전에 절식시키고 마취한 후 가슴샘, 심장, 허파, 간장, 지라, 콩팥(좌우), 고환(좌우)을 절취하여 무게를 측정하였다.

2.5 백혈구 혈액학적 측정 및 혈중

면역글로불린(Immunoglobulin, Ig) 검사

흡입 마취한 마우스에서 심장천자(heart picture)로 혈액을 채취하여 즉시 도말하고 wright' stain 염색하여 백혈구 백분을 계산(differential white cell count; DIF test)을 하였다. 채취한 혈액의 일부는 실온에 30분간 방치한 후 원심분리(3,000 rpm, 30min)하여 얻은 혈청에 대해서 IgG를 측정하였다.

2.6 양적혈구에 대한 항체생산세포 측정

Heparin 처리된 면양적혈구(Sheep red blood cells; SRBC, Hanil Komed, Seongnam, Korea)를 동

량의 Alserver's solution(pH 6.7)을 가하여 4°C에 보관한 후 2주 이내에 항체생산 세포수 측정을 위한 항원으로 사용하였다. 사용직전에 이 SRBC를 PBS 용액(pH 7.2)으로 3회 원심분리(400 g, 5min, 4°C)하여 세척한 후 SRBC 농도가 2×10^9 cells/mL 되도록 PBS용액으로 부유하여 부유액(8×10^8 cells/mL) 200 μ L를 모든 실험 동물군의 복강내 주사하여 면역시켰다.

지라세포의 항체생산세포 측정(Plaque forming cell test: PFC test)은 SRBC에 대한 Geetha 등[25]의 방법을 이용하여 실시하였다. 각 용량의 시료를 8일간 연속으로 복강내 투여한 마우스에 SRBC 항원주사 후 4일 후에 무균적으로 지라를 적출하였다. Zhang 등[26]의 방법에 따라 분리한 지라세포 부유액(1×10^7 spleens cell/mL)에 항원성 20% SRBC 2 ml를 top agar medium(RPMI 1640 medium과 0.6% agarose 혼합액) 시험관에 넣고 잘 혼합한다. 이 혼합액을 RPMI 1640 배지와 1.2% agarose로 미리 만들어 놓은 bottom agar plate에 고루 부어 응고시키고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양 후 30배로 희석한 Guinea pig complement 를 4 ml씩 넣어 plaque 형성을 유도하여 PFC/ 10^6 spleen cell 수를 계수하였다.

2.7 지라 조직검사

지라의 여포변연부의 크기 및 배중심의 형성정도를 비교하기 위해 지라 조직을 10% neutral bufferd formalin 용액(pH 7.4)에 1주 이상 충분히 고정시킨 후 흐르는 물에 24시간 수세한 후, 저농도(70%)에서 고농도(100%) alcohol 단계를 거쳐 탈수하고 xylene으로 투명화한 후 파라핀 포매기(vacuum infiltration processor EC350, Leica, Wetzlar, Germany)에서 포매하였다. 파라핀 블록은 초박절편기(rm2245, Leica, Wetzlar, Germany)로 5~6 μ m 두께의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin stain으로 염색하여 관찰하였다.

2.8 통계처리

통계적 분석은 IBM SPSS Statistics software (ver. 23, IBM Co., NY, USA)를 이용하여 실험결과를 평균± 표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 각 실험군의 차이는 일원배치분산분석법(one way analysis of variance, ANOVA)으로 검증 한 후, 대조군과 실험군의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 유의성을 P<0.05 수준에서 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 체중 및 장기무게 변화

황칠추출물과 황칠-청국장을 투여한 9주 후의 마우스의 체중과 장기무게를 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다. 9주 동안의 체중 증가량은 Control군은 8.04 ± 0.16 g이었고, D 250, D 500, D 750군은 7.76 ± 0.28 , 7.56 ± 1.05 , 8.12 ± 0.28 g이 증가되었다. GC군은 6.72 ± 1.37 , DGC군은 6.76 ± 0.57 g이 증가되었다. 황칠추출물 경구 투여 후 D군 모두 개시 체중에 비하여 체중이 증가하였으며, DGC군은 D군들에 비해 체중 증가량이 다소 낮았으나 통계적 유의성은 없었다. 장기무게의 측정은 병리학적 측면에서 중요한 지표 자료가 될 수 있는 것으로 유의하여 살펴볼 필요가 있고, 간과 지라 및 가슴샘의 측정은 생체 내 면역 및 독성의 측정 지표로 인식되고 있다[27]. 독성의 지표가 되는 간, 심장, 콩팥의 무게가 Control군과 다른 실험군들에 비해 D 750군에서 감소한 것은 황칠 추출물 750mg/kg 투여가 마우스에 고농도로 작용하여 독성을 나타내는 것으로 판단하였다. 따라서 향후에는 황칠 추출물의 고농도에 투여가 마우스의 생육 및 장기에 미치는 독성 효과에 대해 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

가슴샘의 무게는 실험군들 모두 Control군과 유사하였으며 지라의 무게는 D 500, D 750군, GC군에서 체중의 0.4%로 Control 군과 비슷하였으나, D 250군과 DGC군은 Control 군에 비해 0.54%, 0.5% 증가하였다.

Jang 등[28]은 정상 마우스에 백수오 고분자 분획물을 경구 투여한 실험에서 지라과 가슴샘의 무게가 증가하였고 지라세포 유래 림프구의 증식이 나타나 비특이적 면역반응을 증가시켰다고 판단하였는데 본 연구에서도 D 250군과 DGC군의 지라 무게가 증가됨에 따라 면역 기능이 변화됨을 확인하였다.

3.2 SRBC에 대한 PFC test

황칠추출물과 청국장 및 황칠-청국장의 투여에 따른 마우스의 체액성 면역 활성화 여부를 측정하기 위해 PFC test를 측정된 결과, 지라세포(1×10^7 /cells)당 PFC(plaque forming cell)는 D 250과 D 500군에서 각각 100 ± 14.93 , 134 ± 16.46 으로 Control군의 79 ± 12.10 에 비교하여 유의적으로 증가하였다(Fig. 1). 그러나 D 750군에서는 66 ± 11.68 으로 Control군보다 감소하였다. GC군은 82 ± 14.73 으로 Control군과 비슷한 경향을 나타내었으며, DGC군은 111 ± 16.52 으로 D 500군에 비교하여 다소 감소하였다.

최근 천연식품과 약용식물 추출물을 대상으로 면역증진 효과를 규명하는 연구가 시행되고 있다. 된장추출물, 생강, 어성초 및 대두추출물 등을 마우스에 투여한 결과 지라세포의 높은 증식효과가 관찰되었으며, 대식세포로부터 분비되는 IL-1 β , IL-6와 TNF- α 의 사이토카인의 생성이 증가됨을 확인하였다[29]. 또한 인간의 B세포와 T세포에 황칠나무 잎의 에탄올 추출물을 투여하여 면역 활성을 실험한 결과 1.0 mg/ml 농도에서 면역세포 촉진

Table 1. Organ weight of male ICR mouse fed experimental diets after 9 weeks.

Visceral organ	Control	D(mg/kg)			GC(mg/kg)	DGC(mg/kg)
		250	500	750		
Weight (g)	45.28 \pm 5.24	41.74 \pm 2.05	43.00 \pm 3.33	45.10 \pm 4.28	42.52 \pm 3.95	44.02 \pm 5.65
Thymus	0.04 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02
Heart	0.22 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02
Lung	0.23 \pm 0.01	0.23 \pm 0.01	0.22 \pm 0.02	0.22 \pm 0.01	0.23 \pm 0.03	0.24 \pm 0.01
Liver	2.53 \pm 0.50 ^{1bc}	2.29 \pm 0.12 ^{bc}	2.12 \pm 0.20 ^{abc}	2.10 \pm 0.30 ^{ab}	1.74 \pm 0.20 ^a	2.12 \pm 0.32 ^{abc}
Spleen	0.18 \pm 0.05 ^{ab}	0.23 \pm 0.03 ^b	0.17 \pm 0.03 ^a	0.18 \pm 0.03 ^{ab}	0.16 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.02 ^b
Kidney(R)	0.42 \pm 0.05 ^b	0.40 \pm 0.04 ^b	0.34 \pm 0.03 ^a	0.32 \pm 0.03 ^a	0.34 \pm 0.02 ^a	0.33 \pm 0.04 ^a
Kidney(L)	0.40 \pm 0.03 ^b	0.39 \pm 0.04 ^b	0.32 \pm 0.03 ^a	0.31 \pm 0.04 ^a	0.34 \pm 0.03 ^a	0.34 \pm 0.04 ^a
Testis(R)	0.13 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01
Testis(L)	0.13 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02

Control, no treatment group; D, *Dendropanax moribifera* extract; GC, General cheonggukjang 400 mg/kg/days; DGC, General cheonggukjang added with *Dendropanax moribifera* extract 500 mg/kg/day. The values are means \pm SD for each group (n=5).

¹Different letters are statistical significantly as determined by Duncan's multiple test (p<0.05).

활성을 관찰하였으며, IL-6와 TNF- α 의 발현도 모두 증가시키는 것으로 조사되었다[10].

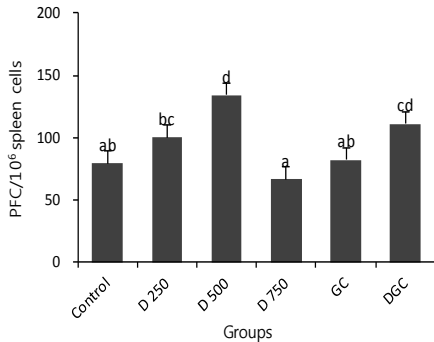


Fig. 1. Plaque-forming cell(PFC) assay by splenocytes isolated from immunized ICR mice. The mice were during oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks and intraperitoneally injected with sheep red blood cells(SRBC). Four days after immunization, PFC per spleen cells was counted under a microscope. Control, no treatment group; D 250, *Dendropanax morbifera* extract 250 mg/kg; D 500, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg; D 750, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg; GC, General cheonggukjang 400 mg/kg; DGC, General cheonggukjang added with *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg. The data are means \pm SD for each group (n=5). Value significantly different from the control (Duncan's multiple comparison test) at p<0.05

본 연구 결과 D 250과 D 500군이 대조군에 비교하여 항체 생산 세포수가 증가되었으며 DGC군의 경우도 대조군과 DC군에 비교하여 항체 생산 세포수가 증가되었다. 이러한 결과는 황칠추출물이 마우스의 지라조직에서 SRBC를 항원으로 인식하고 면역반응을 활성화시킨 것으로 보여진다. 따라서 황칠추출물은 청국장의 면역기능을 증대시킴으로 단독, 또는 다른 식품과의 활용 가능성을 시사해 준다.

3.3 혈중 면역글로불린 검사

면역글로불린(Immunoglobulin, Ig)은 면역계의 주요 구성성분으로 이중 IgG는 혈액과 세포외액에 있는 주요 항체로 세균이나 진균과 같은 병원체에 대하여 감염에 대한 방어에 관여한다[30]. 황칠추출물과 황칠추출물을 첨가한 청국장을 투여한 후 마우스의 혈청 내 IgG

의 농도를 측정된 결과, D 500군(1.48 \pm 0.08 g/dL)이 Control군(1.58 \pm 0.08 g/dL)보다는 다소 낮은 함량을 나타내었다(Fig. 2). GC군(1.56 \pm 0.09 g/dL)과 비교하여 DGC군은 1.64 \pm 0.11 g/dL로 증가됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 청국장 단독 투여에 비교하여 황칠 추출물이 첨가되어 IgG을 활성이 상승된 것으로 황칠 추출물의 면역 활성 증진 효과를 확인하였다.

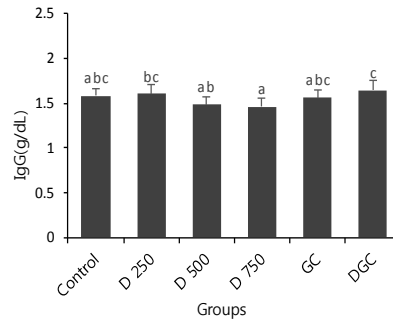


Fig. 2. Comparison of immunoglobulin contents in male ICR mouse during oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks. Control, no treatment group; D 250, *Dendropanax morbifera* extract 250 mg/kg; D 500, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg; D 750, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg; GC, General cheonggukjang 400 mg/kg; DGC, GC added with *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg. The values are means \pm SD for each group (n=5). Different letters are statistical significantly as determined by Duncan's multiple test (p<0.05).

3.4 백혈구 혈액학적 분석

백혈구는 다양한 항원에 대항하여 면역반응을 나타내고 손상된 조직을 복원하는데 작용하는 인체의 중요한 지표중 하나이다[33]. 황칠추출물과 황칠-청국장 동시 투여 후 백혈구의 변화를 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. 호중구(neutrophils)는 Control군과 비교하여 D군의 농도가 증가할수록 감소하였으며, DGC군도 Control군과 비교하여 감소하였다. 단핵구(monocytes)는 Control군에 비교하여 모든 실험군은 감소하였는데, 그중 D 500군과 DGC군에서 대조군에 비교하여 각각 4배 감소하였다. D 군들과 DGC군에서 호산구(eosinophils)와 호염기구(basophils)는 대조군에 비교하여 유의적 차이를 나타내지 않았다. 림프구(lymphocytes)는 Control군 (60.33 \pm 3.21%)에 비교하여 모든 실험군에서 증가하였으며, 그중 D 500군

Table 2. Hematological data from white blood cell of male ICR mouse oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks.

Group	Basophils	Eosinophils	Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes
Control	0.33±0.58	4.00±2.65	29.33±5.03	60.33±3.21 ^{1)a}	6.33±2.31 ^b
250	0.77±0.68	2.33±2.08	28.67±2.31	63.00±2.00 ^a	2.67±1.53 ^a
D(mg/kg) 500	1.00±1.00	3.33±1.53	25.67±5.77	65.67±4.93 ^{ab}	1.33±2.31 ^a
750	1.00±1.00	4.67±1.15	22.33±5.51	73.33±5.51 ^c	2.67±1.53 ^a
GC(mg/kg)	1.67±1.53	3.00±2.65	23.00±2.00	70.67±2.52 ^{bc}	4.00±1.00 ^{ab}
DGC(mg/kg)	1.33±0.58	2.00±1.73	25.00±3.61	65.33±2.89 ^{ab}	1.33±1.15 ^a

Control, no treatment group; D, *Dendropanax morbifera* extract; GC, General cheonggukjang 400 mg/kg; DGC, General cheonggukjang 400 mg/kg added with *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg. The values are means±SD for each group (n=5). ¹⁾Different letters are statistical significantly as determined by Duncan's multiple test (p<0.05).

(65.67±4.93%)에서 높은 측정값을 나타냈다. 이처럼 호중구나 단핵구에 비해 림프구가 증가한 결과는 황칠추출물이 1차 면역보다는 2차면역의 증진에 더 효과적인 것으로 조사되었다.

3.5 지라 조직 검사

지라는 blood-borne pathogen에 대한 면역반응 기관으로 지라속질(splenic pulp)과 피막(capsule)으로 나뉘지며, 속질은 다시 수많은 림프구로 구성된 백색속질과 림프구와 대식세포가 함유된 적색속질로 나누어진다[34]. Control군에서는 적색속질 사이에 하나 이상의 중심동맥 주위에 치밀형으로 축적된 림프구가 보이며 선명한 종자중심이 관찰되었다(Fig. 3A). D 700군은 Control군에 비하여 적색속질은 림프구의 수가 감소되고 백색속질의 종자중심이 위축되었으며, 이러한 조직의 모습은 황칠추출물 750mg/kg 투여가 마우스의 지라조직에 독성으로 작용한 것으로 판단되어진다(Fig. 3D). D 250, D 500, GC군, 그리고 DGC군에서는 D 700군과는 다르게 백색속질의 종자중심이 증식됨이 관찰되었으며(Fig. 3B, 3C, 3E), 특히 DGC군의 백색속질의 증식이 강하게 관찰되었다(Fig. 3F). Lim 등[34]의 가시오가피와 더덕추출물을 마우스에 투여한 실험에서 추출물 투여량이 증가할수록 대조군에 비교하여 지라의 무게와 혈중 면역글로불린(IgG)의 수치도 함께 상승하였으며 백색수질 세포의 증가가 관찰되었다. 이러한 지라조직의 변화는 면역력 상승의 결과로 판단하였다. 또한 면역 억제 현상을 보이는 누드마우스에 폐암이 유발시키고 귀비탕을 투여한 후 면역활성 효과를 관찰한 실험에서도 지라의 중량, 두께 및 백색 수질의 직경이 증가되었고 지라내 IL-1β, IL-10과 TNF-α의 발현도 증가되었다[35].

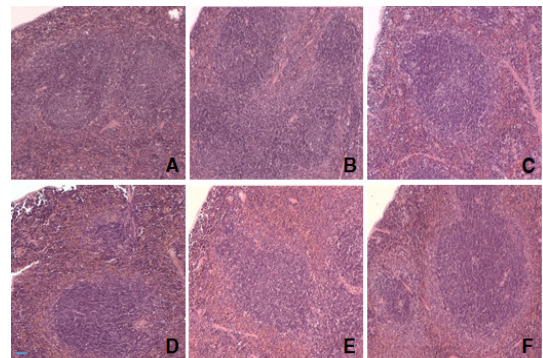


Fig. 3. Light microscopic pictures of the spleen tissue of male ICR mouse during oral administration treated with D, GC and DGC for 9 weeks. Histologic changes in spleen tissue were observed using H&E staining. A, Control; B, *Dendropanax morbifera* extract (D) 250 mg/kg; C, *Dendropanax morbifera* extract 500 mg/kg; D, *Dendropanax morbifera* extract 750 mg/kg; E, Ggeneral chunggukjang 400 mg/kg (GC); F, *Dendropanax morbifera* extract 500mg/kg + Ggeneral chunggukjang 400 mg/kg (DGC). Scale bars=20 μm.

이러한 결과들은 지라의 백색수질 증식이 림프구의 증가를 나타내며 면역활성 사이토카인의 증가와 이에 따른 세포성 면역과 체액성 면역 기작을 유발하여 2차 면역을 유도하게 된다. 본 실험에서도 황칠과 청국장 추출물의 투여가 지라의 백색수질 증가에 따른 림프구의 증식을 유도함으로써 면역활성을 촉진한 것으로 판단된다.

4. 결론

황칠 추출물과 황칠추출물이 첨가된 청국장장의 면역 활성 효능을 조사한 결과 D 250, D 500군에서 마우스의 체중 및 지라과 가슴샘 무게가 증가 되었으며 혈액의 백혈구 백분율과 IgG 농도도 상승되었다. 또한 PFC test 및 지라의 조직에서는 림프구의 증가가 유도되어 황칠추출물의 면역반응 향상을 관찰하였다. 그러나 D 700군에서는 체중감소와 지라 백색속질의 위축과 적색속질의 림프구 감소가 관찰되었다. 고농도의 황칠추출물 투여가 면역반응이 감소하여 독성을 유발하는 것으로 생각되어 황칠추출물 투여농도에 따른 조직 안전성 연구가 더 이루어져야 할 것으로 판단된다. DGC군의 경우 GC군에 비교하여 림프구와 IgG의 농도를 증가시킴으로 2차 면역과 관련된 상승효과가 나타난 것으로 관찰되었다. 이러한 황칠과 청국장 추출물의 면역증진 연구결과는 향후 황칠-청국장을 이용한 다양한 식품개발과 천연 의약품 소재로서 활용에 기여 할 수 있을 것으로 판단된다.

References

- [1] J. M. Chung, S. H. Kim, S. S. Kim, "Population structure and emergence and growth dynamics of seedling and spatial distribution of *Dendropanax morbifera* LEV (Araliaceae)", *Korean J Plant Res*, Vol.11, No.3, pp.345-352, 1998.
- [2] B. S. Jeong, J. S. Jo, B. S. Pyo, B. Hwang, "Studies on the distribution of *Dendropanax morbifera* and component analysis of the golden lacquer", *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*, Vol.10, No.4, pp.393-400, 1995.
- [3] K. P. Lim, Y. S. Kim, W. Y. Chung, "Studies on the Development of Traditional Korean Golden Varnish (Hwangchil)(I)-Anatomical Characteristics and Chemical Composition of Wood and Exudates of Hwangchil-namu (*Dendropanax morbifera*)", *J Korean Wood Sci Technol.*, Vol.25, No.3, pp.24-28, 1997.
- [4] S. A. Park, J. Park, C. I. Park, Y. J. Jie, Y. C. Hwang, "Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts", *Korean J Microbiol Biotechnol*, Vol.41, No.4, pp.407-415, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4014/kimb.1311.11001>
- [5] H. I. Moon, "Antidiabetic effects dendropanaxide from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats", *Human & experimental toxicology*, Vol.30, No.8, pp.870-875, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1177/0960327110382131>
- [6] T. K. Hyun, M. Kim, H. Lee, Y. Kim, E. Kim, J. S. Kim, "Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Léveille", *Food Chemistry*, Vol.141, No.3, pp.1947-1955, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.021>
- [7] K. J. Im, S. B. Jang, D. Y. Yoo, "Anti-cancer effects of *Dendropanax morbifera* extract in MCF-7 and MDA-MB-231 cell", *The Journal of Korean Obstetrics and Gynecology*, Vol.28, No.2, pp.26-39, 2015. DOI: <https://doi.org/10.15204/jkobgy.2015.28.2.026>
- [8] Y. B. Jo, J. H. Lee, "A study on the effect of the *Dendropanax Mobifera* extract on anti-hypertensive", *J Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.17, No.11, pp.708-715, 2016. DOI: <http://doi.org/10.5762/KAIS.2016.17.11.708>
- [9] T. K. Hyun, Y. J. Ko, E. H. Kim, I. M. Chung, J. S. Kim, "Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts", *Industrial Crops and Products*, Vol.74, pp.263-270, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.002>
- [10] S. H. Lee, H. S. Lee, Y. S. Park, B. Hwang, H. Kim, "Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev", *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol.10, No.2, pp.109-115, 2002.
- [11] S. H. Kim, J. L. Yang, Y. S. Song, "Physiological functions of Chongkukjang", *Food Indust. Nutr*, Vol.4, No.2, pp.40-46, 1999.
- [12] J. H. Lee, S. H. Nam, W. T. Seo, H. D. Yun, S. Y. Hong, "The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells", *Food Chemistry*, Vol.131, No.4, pp.1347-1354, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.133>
- [13] S. H. Hwang, H. S. Chung, S. D. Kim, K. S. Youn, "Effect of *Glycyrrhiza uralensis* extract addition on the quality of cheonggukjan", *J East Asian Soc Dietary Life*, Vol.14, No.6, pp.571-575, 2004.
- [14] S. Heo, H. K. Joo, S. K. Lee, "Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional cheonggukjan", *Applied Biological Chemistry*, Vol.41, No.2, pp.119-124, 1998.
- [15] W. S. Cha, S. K. Bok, M. U. Kim, S. S. Chun, S. S. Choi, "Production and separation of anti-hypertensive peptide during cheonggukjang fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023", *Applied Biological Chemistry*, Vol.43, No.4 pp.247-252, 2000.
- [16] B. H. Sohn, Y. J. Song, K. H. Oh, "Fibrinolytic activity and characterization of *Bacillus licheniformis* HK-12 isolated from cheonggukjang", *KSBB Journal*, Vol.23, No.3, 251-256, 2008.
- [17] J. Y. Hong, E. J. Kim, S. R. Shin, T. W. Kim, I. J. Lee, "Physicochemical properties of cheonggukjang containing Korean red ginseng and *Rubus coreanum*", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol.15, No.6, 872-877, 2008.
- [18] M. H. Ki, S. H. Kim, H. S. Cho, B. H. Park, "Quality characteristics of cheonggukjang added with peanut

- (*Arachis hypogaea* L.) powder”, Korean J Food Preserv, Vol.23, No.4, pp.488-494 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.11002/kjfp.2016.23.4.488>
- [19] J. J. Lee, A. R. Kim, H. C. Chang, M. Y. Lee, “Antioxidative effects of chungkukjang preparation by adding solar salt”, Korean Journal of Food Preservation, Vol.16, No.2, pp.238-245, 2009.
- [20] Y. K. Jung, Y. K. Lee, H. K. No, S. D. Kim, “Effect of sea tangle on fermentation and quality characteristics of Cheongbukjang”, Korean Journal of Food Preservation, Vol.13, No.1, pp.95-101, 2006.
- [21] M. Lee, Y. G. Lee, J. I. Cho, K. C. Na, E. J. Hwang, “Preparation of cheonggukjang added onion (*Allium cepa* L.) and its antioxidative activity.”, Korean Journal of Food Preservation, Vol.21, No.1, pp.46-54, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.11002/kjfp.2014.21.1.46>
- [22] K. Lee, J. O. Jang, H. K. Yoon, M. S. Kim, “Antithrombotic activities of cheongkookjang and cheongkookjang fermented with green tea or mugwort”, Korean Journal of Microbiology, Vol.43, No.3, pp.298-303, 2007.
- [23] J. S. Park, H. S. Na, “Properties of cheonggukjang tablet prepared with medicinal herb extracts”, Korean J Food Preserv, Vol.18, No.2, pp.149-155, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.11002/kjfp.2011.18.2.149>
- [24] S. I. Lee, J. G. Shin, S. D. Kim, “Effect of Red Ginseng - Chungkukjang Extracts on Lipid Profiles of Serum in Alcohol Administered Diabetes - Induced Rats”, J Korean Soc Food Sci Nutr, Vol.34, No.9, pp.1362-1366, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/ikfn.2005.34.9.1362>
- [25] B. S. Geetha, P. G. Latha, S. N. Mangalam, P. Remani, “In vivo approaches to investigate the immune response of plant-based anti tumour drug, *Elephantopus scaber* L”, Annals of Pharmacology and Pharmaceutics, Vol.2, No.1, 1011, 2017.
- [26] W. Zhang, J. Y. Du, Z. Jiang, T. Okimura, T. Oda, “Ascophyllan purified from *Ascophyllum nodosum* induces Th1 and Tc1 immune responses by promoting dendritic cell maturation”, Marine Drugs, Vol.12, No.7, pp.4148-4164, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md12074148>
- [27] J. S. Lim, “Effect of immune function on the fermentation of Kimchi intake to append *Acanthopanax cortex* extract in Balb/c mice”, Thesis Collect Res Inst Korean Medicine, Vol.12, No.1, pp.1-9, 2003.
- [28] M. Jang, T. G. Lim, H. D. Hong, Y. K. Rhee, K.T. Kim, E. J. Lee, J. H. Lee, Y. J. Lee, Y. B. Kim, C. W. Cho. “Immuno-stimulatory Activities of a High Molecular Weight Fraction from *Cynanchum wilfordii* Radix Obtained by Ultrafiltration”, Korean J. Food Sci. Technol. Vol.48, No.3, pp.268~274, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.2016.48.3.268>
- [29] J. Kim, H. S. Ryu, J. H. Shin, H. S. Kim, “In vitro and Ex vivo supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice”, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, Vol.34, No.2, pp.167-175, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2005.34.2.167>
- [30] S. H. Park, M. J. Kim, G. E. Kim, S. Y. Park, K. Kim, “Immuno-enhancing effect of enzymatic extract of *Sargassum coreanum* using crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 100”, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, Vol.46, No.8, pp.919-928, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2017.46.8.919>
- [31] D. L. Mallery, W. A. McEwan, S. R. Bidgood, G. J. Towers, C. M. Johnson, “Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21)”, PNAS, Vol.107, No.46, pp.19985-19990, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1014074107>
- [32] A. Atala, D. J. Irvine, M. Moses, S. Shaunak, “Wound healing versus regeneration: role of the tissue environment in regenerative medicine”, MRS Bulletin, Vol.35, No.8, pp.597-606, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1557/mrs2010.528>
- [33] KABLSP. Histology, 6th ed. Korean medical publishing company, Korea, p254-255, 2017.
- [34] S. D. Lim, K. S. Seong, K. S. Kim, D. U. Han, “Effects of fermented milk with hot water extract from *Acanthopanax senticosus* and *Codonopsis lanceolata* on the immune status of mouse”, Korean Journal of Food Science and Technology, Vol.39, No.3, pp.323-329, 2007.
- [35] J. Y. Son, H. Y. Choi, J. D. Kim, “Anticancer and Related Immunomodulatory Effects of Kwibi-tang on Non-small Cell Lung Carcinoma, NCI-H520, Xenograft Mice”, The Journal of Internal Korean Medicine, Vol.33, No.4, pp.387-404, 2012.

김진솔(Jin-Sol Kim)

[정회원]



- 2017년 2월 : 조선대학교 생명과학과 (이학사)
- 2019년 2월 : 조선대학교 일반대학원 생명과학과 (이학석사)
- 2019년 4월 ~ 현재 : 조선대학교 자연과학대학 생명과학과 연구원

<관심분야>

식품생리, 분자생물

정 민 주(Min-Ju Cheong)

[정회원]



- 1998년 8월 : 조선대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 2004년 2월 : 조선대학교 대학원 생물학과 (이학박사)
- 2001년 3월 ~ 2018년 8월 : 조선대학교 생명과학과 시간강사
- 2019년 3월 ~ 현재 : 동강대학교 보건행정과 시간강사

<관심분야>

해부학, 생리학

이 현 화(Hyun-Hwa Lee)

[정회원]



- 1998년 2월 : 조선대학교 일반대학원 생물학과 (이학석사)
- 2002년 8월 : 조선대학교 일반대학원 생물학과 (이학박사)
- 2006년 3월 ~ 현재 : 조선대학교 생명과학과 교수

<관심분야>

식물생리, 면역

정 경 아(Kyoung-A Chung)

[정회원]



- 1993년 8월 : 조선대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 1998년 8월 : 조선대학교 대학원 생물학과 (이학박사)
- 2014년 3월 ~ 2017년 8월 : 동신대학교 작업치료학과 교수
- 2017년 9월 ~ 현재 : 광주보건대학교 임상병리과 교수

<관심분야>

해부학, 생리학

송 선 영(Seon-Young Song)

[정회원]



- 1997년 2월 : 조선대학교 일반대학원 생물학과 (이학석사)
- 2008년 2월 : 조선대학교 일반대학원 생물학과 (이학박사)
- 1999년 3월 ~ 2002년 2월 : 제주한라대학 피부미용과 전임강사
- 2002년 3월 ~ 현재 : 광주보건대학교 피부미용과 교수

<관심분야>

약용식물, 면역