

카카오 열수 추출물 투여의 마우스 면역세포 활성화효과

†류 혜 숙

상지대학교 보건의료과학대학 식품영양학과 교수

Effect of *Theobroma cacao* L. Extracts on Mouse Spleen Immune Cells Activation

†Hye-Sook Ryu

Professor, Dept. of Food and Nutrition, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju 26339, Korea

Abstract

Theobroma cacao L., a fruit of cacao trees, is a perennial plant, which belongs to Sterculiaceae, and is native to the Amazon in South Africa. It also has been known for its various biologically active effects, such as anti-oxidation, anti-cancer, and anti-bacterial. The spleen cell proliferations of mice were measured at 48 hours after treatment of *Theobroma cacao* L. water extracts in seven concentrations(0, 5, 10, 50, 100, 250, 500 and 1,000 µg/mL) an ELISA assay. The production of cytokine (IL-1β, TNF-α, IFN-γ), is secreted by macrophages stimulated with LPS, was detected by ELISA assay using the cytokine kit. From the results of in vitro study, both splenocytes and cytokine production activated by peritoneal macrophages have increased when water extracts were supplemented in the range between 250 and 500 µg/mL concentration. Notably, splenocytes production has a significant proliferation at 500 µg/mL concentration. The result from this research suggests that supplementation with *Theobroma cacao* L. water extracts may enhance the immune function by stimulating the splenocyte proliferation and improving the cytokine production activating macrophage in vitro.

Key words: splenocytes proliferation, *Theobroma cacao* L., cytokine, immune

서 론

다년생 식물인 카카오(*Theobroma cacao* L.)는 카카오나무의 열매로 중남미, 아프리카가 원산지이다. 세계 카카오 생산량의 약 70%는 아프리카에서 생산되며, 중남미 대륙에서 20%, 동남아시아에서 약 10%가 생산되는 것으로 알려져 있다(Kang SY 2017). 카카오는 폴리페놀(polyphenol) 함량이 높은 것으로 보고되고 있으며, 알칼로이드(alkaloid) 화합물 카페인(caffeine), 테오브로민(theobromine) 성분이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Karim 등 2014). 카카오를 이용한 생리활성효능으로는 항산화(Kim 등 2012; Karim 등 2014), 항노화(Scapagnini 등 2014), 항염증의 효과가 보고되어 있다(Smit 등 2014). 특히 피부질환과 관련하여 항염증(Lee 등 2008), 항피부암 등에 대한 연구가 다양하게 보고되

고 있다(Lee KL 2007). 반면, 카카오를 이용한 면역능 연구는 알려진 것을 거의 찾아볼 수 없었다. 식물 추출물을 이용한 면역능에 관한 연구로는 울무 물 추출물과 수수, 톳 물 추출물의 마우스 경구투여의 비장세포 증식과 사이토카인 생성을 증진시킨 것으로 알려져 있다(Ryu & Kim 2004; Ryu 등 2005; Kim 등 2006; Ryu 등 2007). 또 더덕 물 추출물의 면역능이 보고된 바 있으며(Suh JS 1996; So 등 2004; Ryu 등 2009), 최근의 선행 연구로는 호박고구마 열수 추출물이 면역세포 활성을 증진시킨다는 연구가 보고 된 바 있다(Ryu HS 2020). 최근 식물을 활용한 면역능과 질병예방효과 검증에 관한 연구 또한 활발하게 이루어지고 있으며, 면역 질환 환자에게서 IL-2, IFN-γ 분비가 증가되는 현상에 대한 연구 결과를 보고한 바 있다(Bhol 등 2000; Giurdanella 등 2013). 따라서 본 연구에서 천연식물소재 카카오 열수 추출물 저농

† Corresponding author: Hye-Sook Ryu, Professor, Dept. of Food and Nutrition, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju 26339, Korea. Tel: +82-33-738-7641, Fax: +82-33-730-0186, E-mail: rhs7420@sangji.ac.kr

도에서 고농도 5, 10, 50, 100, 250, 500 and 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 달리하여 카카오 열수 추출물이 마우스 비장세포를 증식시키는 활성이 있는지 확인하고, 사이토카인(IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) 분비능을 측정하여 면역세포의 활성화효과를 확인함으로써 *ex vivo* 실험의 기초자료로 활용하여 더 폭 넓은 실험의 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료 준비 및 실험 마우스

건조된 페루산 카카오 열매를 인터넷 사이트에서 구입 (2018)하여, 증류수로 환류 냉각시키면서 60~70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3회에 걸쳐 추출하였다. 이를 감압 농축의 방법으로 열수 추출물을 획득했다(Fig. 1). (주)대한바이오센터에서 공급받은 실험동물은 8~9주령 된 수컷 ICR mouse를 사용하였다(승인번호 2018-10). 고형사료와 물을 자유롭게 공급하면서 일주일 정도 실험 동물실험실에서 안정시켜, 체중이 15~16 g 내외가 되도록 적응시킨 후 실험에 이용하였다. 실험 동물실험실 습도는 50 \pm 10%, 온도는 22~24 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 조절하며 관리하였다.

2. 마우스의 비장세포 분리 및 배양

마우스 비장세포의 분리는 Mishell & Shiigi(1980)의 방법

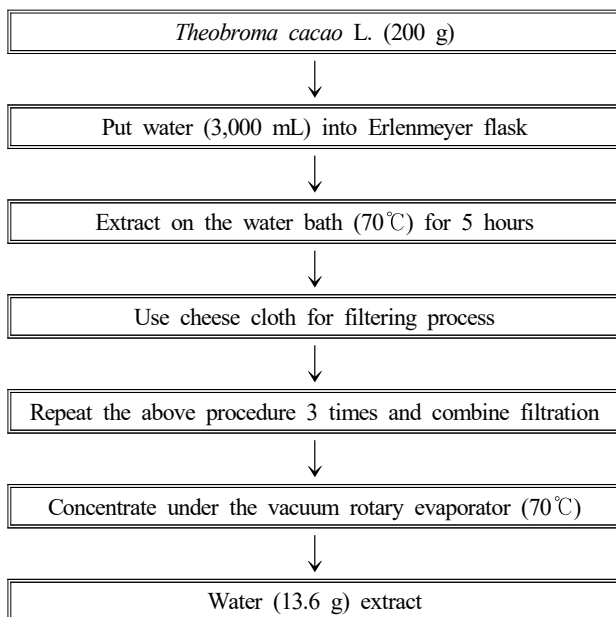


Fig. 1. Glucose production content by starch degradation enzymes in commercial porridge. Means with different letters within the same column are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

으로 측정하였으며. 경추 탈골법의 방법으로 희생시킨 후 마우스의 비장세포를 분리해내어, 200 mesh stainless steel sieve (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 세포를 통과시켜 원심분리 하는 방법으로 실시하였다. 원심분리 조건은 3,000 rpm에서 15분간 3회의 과정으로 진행하였다. 이와 같이 적혈구를 제거한 비장세포를 또 다시 RPMI medium 1640용액에 처리하여, trypan blue solution으로 염색하여 hemocytometer를 이용하여 세포수를 확인하였다.

3. 사이토카인(IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) 분비량 측정

마우스의 희생은 경추 탈골법으로 시행하였다. 복부의 피부를 절개한 마우스에서, 배지 RPMI 1640을 복강에 주입하여 대식세포를 수집하였다. 얻어진 세포는 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리 하였다. 이렇게 cell pellet을 RPMI medium 1640용액으로 원심 세척한 후 대식세포는 1×10^6 cell/mL의 세포농도가 되도록 희석하였다. 24-well plate에 1 mL씩 분주하여 인큐베이터에서 부착시킨 세포는 2시간 후에 상층액을 걸어내고 시료와 FBS-RPMI-1640을 분주하여 실험을 진행 하였다. 사이토카인 분비량은 ELISA 사이토카인 kit(R&D system, NY, USA)로 측정하여 결과를 얻었다.

4. 통계분석

실험으로 얻어진 연구 결과는 통계 프로그램인 SAS program (Ver. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 평균 및 표준편차를 계산하였으며, 각 군 간의 비교는 분산분석 (Analysis of Variance, ANOVA)을 사용하여 검정하여 데이터로 활용하였다. 분석시 사용한 유의수준은 $p = 0.05$ 였다.

결과 및 고찰

1. 카카오 열수 추출물이 마우스 비장세포 분비에 미치는 효과-In vitro

카카오 열수 추출물은 0, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 투여하여 배양하였다. 대조군(positive control)으로 미토젠 ConA(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 투여하여 배양하였다. 결과는 Table 1과 같다. 미토젠 ConA를 첨가한 경우 대조군에 비해 세포 증식능이 2.67 \pm 0.12로 증가하였다. 카카오 열수 추출물을 첨가한 농도 0, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 1.00 \pm 0.09, 0.96 \pm 0.21, 1.25 \pm 0.17, 1.60 \pm 0.16, 2.02 \pm 0.19, 1.94 \pm 0.12, 2.47 \pm 0.27, 1.51 \pm 0.14의 결과를 나타냈다. 이 같은 결과에 의하면 카카오 열수 추출물을 투여한 50~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의적인 효과를 나타내었다($p < 0.05$). 그 중에서 특히 50~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 높은 생성량을 나타내었다($p < 0.05$). 이러한 연구 결과는 선행 연구된 호박고구마 열

Table 1. Differences of the proliferation index in mice splenocyte between cultured with extracted water of *Theobroma cacao* L. and mitogen

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Proliferation index ¹⁾		Mitogen
	Water	Con A	
0	1.00 \pm 0.09 ^{a2)}		
5	0.96 \pm 0.21 ^a		
10	1.25 \pm 0.10 ^{ab}		
50	1.60 \pm 0.16 ^c		
100	2.02 \pm 0.19 ^d	2.67 \pm 0.12	
250	1.94 \pm 0.12 ^d		
500	2.47 \pm 0.27 ^e		
1,000	1.51 \pm 0.14 ^{bc}		

¹⁾ Proliferation index=mean of O.D. in test wells/mean of O.D. in control wells.

²⁾ Means \pm S.D.

^{a-e}Means with different superscript (^{a-e}) within a column significantly different from each other ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test ($a<b<c<d<e$).

수 추출물과 생강 물 추출물 50과 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적으로 높게 나타난 연구 결과와 유사한 경향을 보였다(Ryu & Kim 2004; Ryu HS 2020). 또 다른 카카오의 항산화 활성에 관한 연구 결과에 따르면, 카카오 분획물이 NO생성과 iNOS, COX-2 protein 발현을 억제하여 항염증 반응에 관여하는 것으로 보고된바 있으며(Kang SY 2017), 특히 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 활성이 높게 나타났음을 보고하였다. 이처럼 50~500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 투여한 카카오 물 추출물이 면역세포 활성화에 효과를 보여준 결과라 사료된다.

2. 카카오 열수 추출물이 사이토카인 분비량에 미치는 영향

1) IL-1 β 분비량

IL-1 β 생성량은 Fig. 2와 같다. 본 실험에서는 대식세포에 ConA를 처리하여 배양한 상층액 부분을 사용하였다. IL-1 β 생성량은 음의 대조군(0 $\mu\text{g/mL}$)을 비교한 결과 250~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 높게 나타났으며, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 가장 높은 결과를 보여주었다($p<0.05$). 양의 대조군(0 $\mu\text{g/mL}$) 미토젠 ConA 투여군에서는 136.47 \pm 10.11 pg/mL IL-1 β 가 분비되었다. 카카오 열수 추출물 250 $\mu\text{g/mL}$ 첨가농도에서 43.53 \pm 7.86 pg/mL, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 241.05 \pm 21.09 pg/mL, 분비량, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 77.93 \pm 14.65 pg/mL 분비량을 나타내었다. 따라서 카카오 열수 추출물 투여시에는 250~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 IL-1 β 분비량을 증가시키는 것으로 나타나며, 낮은 농도에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 선행

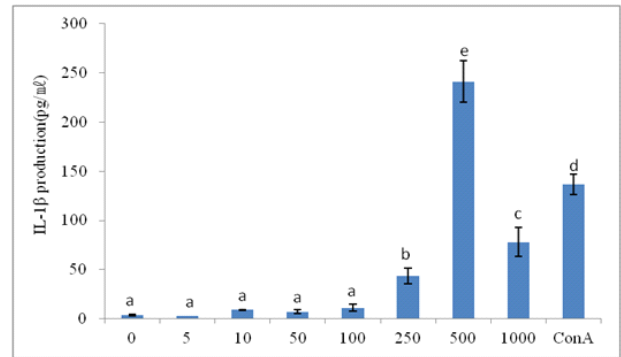


Fig. 2. IL-1 β production by activated peritoneal macrophage cultured with *Theobroma cacao* L. water extracts. ^{a-d}Means with different superscript (^{a-d}) within a column significantly different from each other ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test ($a<d$).

연구된 도토리 물 추출물을 투여 실험의 IL-1 β 분비량이 500 mg/kg B.W 농도에서 높게 나타난(Ryu HS 2010) 결과가 보고된바 있으며, 호박고구마 물 추출물 첨가 실험에서도 100~500 mg/kg B.W 농도에서 분비량을 나타내었다(Ryu HS 2020).

2) IFN- γ 분비량

Fig. 3에 나타난 결과와 같이 IFN- γ 활성 효과를 보여주었다. 대식세포에 ConA를 양의 대조군으로 처리하여 배양한 상층액을 사용하였다. 음의 대조군은 56.78 \pm 10.88으로 나타났으며, 양의 대조군 ConA에서 3,420.95 \pm 325.30 pg/mL로 유의적으로 높은 IFN- γ 가 분비되었다. 카카오 열수 추출물의 농도 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 를 첨가한 농도에서 62.23 \pm 13.06, 18.62 \pm 17.52, 204.19 \pm 36.08, 325.13 \pm 48.79, 1,804.09 \pm

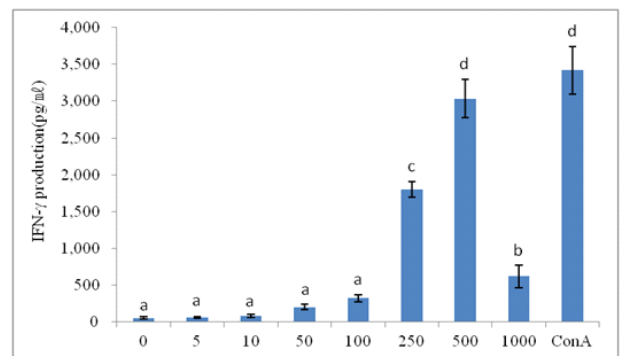


Fig. 3. Peritoneal macrophage-induced-IFN- γ production by activated peritoneal macrophage cultured with *Theobroma cacao* L. water extracts. ^{a-d}Means with different superscript (^{a-d}) within a column significantly different from each other ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test ($a<d$).

103.55, 3,032.80±259.68, 622.10±152.30 pg/mL의 IFN- γ 분비량 수준을 보였다. 특히, 카카오열수 추출물 투여의 250-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의적으로 높았다($p<0.05$). 이러한 결과처럼 카카오 열수 추출물이 IFN- γ 분비를 자극시켜 면역세포 생성량에 기여할 가능성을 보여준 결과이다. 호박고구마의 물 추출물 투여한 실험에서도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의적으로 높게 나타난 결과가 있으며, 이와 유사한 경향을 보이는 결과라 할 수 있다(Ryu HS 2020). 이는 카카오 열수 추출물 투여가 외부 항원으로부터의 자극이 있을 때 면역 반응을 촉진시킬 가능성이 예측되는 결과로 사료된다. 이는 전구 염증성(proinflammatory) 사이토카인인 IFN- γ (Sypek 등 1994)가 어떤 종류의 항염증성(antiinflammatory) 사이토카인 생성을 억제 시켜, 사이토카인의 균형을 조절하는 것으로 알려진 이론적 배경과 관련되어 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다(Pisa 등 1992). 다른 연구로는 표고와 새송이 버섯을 투여한 생쥐의 50 mg/kg과 500 mg/kg의 농도군에서 각각 18.93±0.51 pg/mL, 24.91±0.83 pg/mL, 21.41±1.5 pg/mL, 28.28±3.24 pg/mL로 대조군 15.18±6.25 pg/mL에 비해 높은 생성능을 보여준 연구 결과가 있다(Park 등 2011).

3) TNF- α 분비량

TNF- α 생성량의 결과는 Fig. 4에서 보여주는 것처럼, 음의 대조군은 180.28±29.20 pg/mL의 TNF- α 가 분비되었다. 양의 대조군 ConA(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가한 경우에는 2,499.09±215.23pg/mL의 TNF- α 가 분비되어 대조군에 비해 유의적으로 높은 TNF- α 을 분비능을 보였다($p<0.05$). 카카오 열수 추출물 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 첨가한 경우 각각 525.97±67.88, 2,316.51±130.40, 5,219.49±201.98, 5,572.44±198.13, 3,338.89±

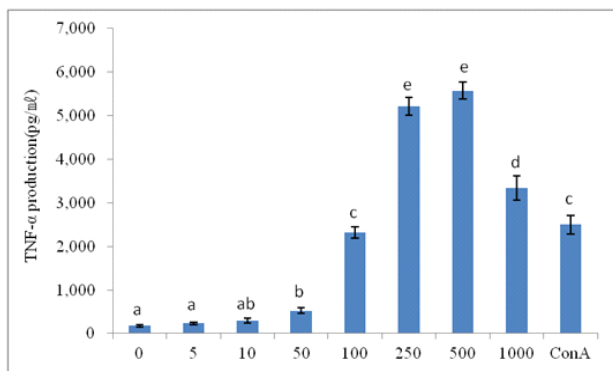


Fig. 4. Peritoneal macrophage-induced-TNF- α production cultured with *Theobroma cacao* L. water extracts. ^{a-c}Means with different superscript (^{a-c}) within a column significantly different from each other ($p<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test ($a<e$).

278.08 pg/mL로 높은 TNF- α 분비량을 보였다. 결과를 종합해 보면 카카오 열수 추출물을 첨가한 50~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 모두에서 유의적으로 높은 생성량을 나타내었다($p<0.05$). 느타리버섯 물 추출물과 호박고구마 물 추출물의 경우에도 유사한 결과를 보여주었다(Ryu 등 2017; Ryu HS 2020). Park 등 (2011)의 연구에서도 통계적으로 유의성은 보이지 않았으나 높은 생성능을 나타낸 보고가 있다.

요약 및 결론

카카오 열수 추출물 첨가가 마우스의 면역세포 증식에 미치는 영향에 대한 연구에서, 음의 대조군에 비해 카카오 열수 추출물을 첨가한 군의 50~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의적으로 증가하였다. 사이토카인 분비량의 결과는 IL-1 β , IFN- γ , TNF- α cytokine 측정 결과 IL-1 β 는 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서, IFN- γ 와 TNF- α 는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 가장 높은 생성능을 보였다($p<0.05$). 이러한 결과를 종합해 볼 때 카카오 열수 추출물의 250~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 모두에서 마우스 비장 세포를 활성화시켜 사이토카인 분비량을 높여 효과를 나타낼 것으로 보인다. 따라서 카카오 열수추출물이 면역 기관과 면역세포를 자극하여 면역세포를 활성화시켜 면역세포증식에 효과가 있을 것으로 기대한다. 본 연구의 마우스 실험 결과가 임상에 바로 적용 될 수 없는 한계점이 있으며, 추후 임상 실험 진행과 성분 분석을 통한 기능성 소재 개발이 가능할 수 있기를 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것임.

References

- Bhol KC, Rojas AI, Khan IU, Ahmed AR. 2000. Presence of interleukin 10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid. *Cytokine* 12:1076-1083
- Giurdanella F, Fania L, Gnarr M. 2013. A possible role for CD8+ T lymphocytes in the cell-mediated pathogenesis of *Pemphigus Vulgaris*. *Mediators Inflamm* 2013:764290
- Kang SY. 2017. Development of gel formulation containing alkaloid of cacao extract. *Korean J Plant Resour* 30:535-541
- Karim AA, Aziant A, Ismail A, Hashim P, Gani SSA, Zianudin BH, Abdullah NA. 2014. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa

- pod extract. *BMC Complementary Altern Med* 14:381
- Kim KO, Kim HS, Ryu HS. 2006. Effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (*Sorghum, su-su*) water extracts on mouse immune cell activation. *J Korean Diet Assoc* 12:82-88
- Kim YS, Lee JY, Cho YJ, An BJ. 2012. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of the solvent fraction from *Theobroma cacao* L. extract. *J Life Sci* 10:1330-1338
- Lee BB, Park SR, Han SC, Han DY, Park E, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against a α -glucosidase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:405-409
- Lee KL. 2007. Cancer chemo-preventive effect and physiological activities of cacao chocolate. *Food Machinery* 4:27-29
- Mishell BB, Shiigi SM. 1980. Selected Methods in Cellular Immunology. WH Freeman
- Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Buchi A. 1992. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Nual Acad Sci* 89:7708-7712
- Park HJ, Heo Y, Kim JB. 2011. Immunomodulating effect of edible mushrooms in mice. *J Life Sci* 21:515-520
- Ryu HS, Jung YH, Kim HS. 2007. Effect of *Hizikia fusiforme* water extracts on mouse immune cell activation. *Korean J Nutr* 40:624-629
- Ryu HS, Kim HK. 2004. Effect of *Zingiber officinale* Roscoe extracts on mice immune cell activation. *Korean J Nutr* 37:23-30
- Ryu HS, Kim HS. 2005. Effects of Job's Tear (Yul Mool) extracts on mouse immune cell activation. *J Korean Diet Assoc* 11:44-50
- Ryu HS, Jung YH, Kim HS. 2007. Effect of *Hizikia fusiforme* water extracts on mouse immune cell activation. *Kor J Nutr* 40:639-649
- Ryu HS, Kim KO, Kim HS. 2009. Effects of plant water extract *Codonopsis lanceolatae* on mouse immune cell activation *ex vivo*. *Korean J Nutr* 42:207-212
- Ryu HS. 2009. Effect of corn extracts on mouse splenocyte and cytokine production by peritoneal macrophage. *Korean J Food Nutr* 24:65-70
- Ryu HS. 2010. Effects of water extract acorn on mouse immune cell activation *ex vivo*. *Korean J Food Nutr* 23:135-140
- Ryu HS, Kim KO. 2017. Enhancing effect of plantain (*Plantago asiatica* L.) extracts on mouse spleen and cytokine cells activation. *Kor J Food Nutr* 30:501-514
- Ryu HS. 2020. Effect of pumpkin sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) water extracts on mouse spleen and cytokine cell activation. *Korean J Food Nutr* 33:317-321
- Scapagnini G, Davinelli S, Renzo LD, de Lorenzo A, Olarte HH, Micali G, Cicero AF, Gonzalez S. 2014. Cocoa bioactive compounds: Significance and potential for the maintenance of skin health. *Nutrients* 6:3202-3213
- Smit HJ, Blackburn LD. 2014. Reinforcing effects of caffeine and theobromine as found in chocolate. *Psychopharmacology* 181:101-106
- Sypek JP, Chung CL, Mayer SH, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG. 1994. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 263:235-237
- So MS, Lee JS, Yi SY. 2004. Induction of nitric oxide and cytokines in macrophages by *Codonopsis lanceolatae*. *Korean J Food Scl Technol* 36:986-990
- Suh JS. 1996. Effect of *Codonopsis lanceolata* radix water extract on immunocytes. *Korean J Food Nutr* 9:379-384

Received 03 November, 2020

Revised 27 November, 2020

Accepted 10 December, 2020