

Immunoactivity-Enhancing Effect of Fermented Samultang Porridge in an Animal Model of Cyclophosphamide-Induced Immunodeficiency

Ji-Hye Oh^{1,*}, Seung-Hwa Baek^{1,**}, Hak-Joo Cho^{2,***} and Seock-Yeon Hwang^{1,†,****}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea

²Department of Herbology, Collge of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea

Recently, as a health problem of the elderly in an aging society, the risk of nutritional imbalance and weakening of immunity due to deterioration of masticatory function has been mentioned. In order to solve this problem, this study was conducted to investigate the effect of cyclophosphamide (CPA)-induced immunosuppression in mice induced by fermented samultang (FST) porridge on the markers related to immune activity function. ICR Mouse was divided into 6 groups of 7 animals each. Experimental groups were set as normal control group, CPA-administration group, positive control group, and FST-administration experimental group (0.25%, 0.5%, 1.0%). In groups except for the normal control group, 100 μ L of CPA dissolved in 0.9% NaCl at a concentration of 150 mg/kg was injected twice at the start of the experiment and after 3 days to induce immunosuppression. As a result of analyzing the cell proliferation capacity of splenocytes, all B and T cells decreased in the CPA-administered group and increased in a concentration-dependent manner in the FST-administered group. In addition, IgA measured to evaluate the effect of improving immunity showed high values in medium and high concentration FST ($P < 0.05$). These results can be expected as an effective solution to improve the nutritional imbalance of the elderly.

Key Words: Aging society, Cyclophosphamide, Fermented Samultang (FST), Immune-Enhancing

서 론

현재 우리나라는 경제발전 및 보건의료 질 향상 등으로 평균수명이 늘어났지만 출산 및 결혼 기피, 노인 인구의 증가로 고령화가 현대 사회에서 중요한 문제로 인식되고 있으며, 노년기 동안 질병 및 장애가 없는 건강한 삶에 관심을 기울이고 있다(Mumma and Quinton, 1970; Bang and Yang, 2008). 최근 급격한 고령화로 인해 노인의 신체 및 인지기능 저하 등 노인 건강과 관련된 문제가 증가하고 있다(Kim and Joo, 2015). 특히 구강 상태 악화로 저작기능이 떨어져 소화과정에서 영양소 섭취가 부족해

지면서 영양불균형을 초래한다고 보고되고 있다(Choi and Mun, 2018). 국민건강통계자료에 따르면, 65세 이상 노인들의 저작 불편 호소율이 33.1%이고, 구강기능 제한율이 34.8%로 나타났으며, 전체 노인 인구의 약 30% 이상이 저작 운동에 불편을 겪고 있다고 발표되었다(Oh et al., 2022). 선행연구 조사 결과, 저작 능력이 저하된 노인은 정상 노인보다 에너지 섭취율이 감소하고, 많은 저작 운동이 필요로 하는 과일 및 채소 섭취율이 감소한 것으로 나타났다(Mumma and Quinton, 1970). 이처럼, 저작작용이 편한 음식을 주로 선택하는 식이 섭취 습관이 형성되면서 노인의 신체기능 저하, 정신적 스트레스, 체중 감소를 유발하게 된다. 또한, 노화가 진행됨에 따라 체내 항체

Received: September 11, 2023 / Revised: September 22, 2023 / Accepted: September 22, 2023

*Ungraduate student, **Graduate student, ***Researcher, ****Professor.

†Corresponding author: Seock-Yeon Hwang, Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea.

Tel:*** - **** - **** Fax: +82-42-283-8808, e-mail: syhwang@dju.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

생성이 감소하고, 면역세포가 외부 항원에 약하게 반응하며, 감염에 취약해져 질병 노출에 영향을 끼치게 된다. 하나의 예로, 2017년 국민건강보험공단의 발표에 의하면, 노인에게서 흔하게 나타나는 만성 자가면역질환인 류마티스 관절염(Song, 2021)의 경우 매년 증가하는 추세를 보이고 있으며, 연평균 증가율이 40대와 50대는 각각 2.5%인 반면, 70대는 6.0%, 80대 이상은 9.0%로 증가율이 높아지고 있다(Park and Lee, 2017). 이처럼, 노년이 되면서 취약해지는 체내 면역력 저하를 예방하기 위해, 적절한 영양 섭취는 노년의 면역력 증진에 중요한 결정요인이 된다(Lee, 2008).

현재, 우리나라보다 30년 앞서 고령화가 진행되어 세계 장수국가로 알려진 일본은 저작, 연하(삼킴) 곤란과 질병 예방에 대한 노령 건강식품개발이 활발하게 이루어지고 있지만, 우리나라의 경우 고령 친화 식품 산업시장이 초기 단계로, 고령자들의 생리적 특성에 맞는 제품개발의 도입이 늦어진 특징이 있다. 또한, 최근까지의 면역증진 활성 연구 대부분이 면역억제제의 부작용이나 독성을 경감시킬 수 있는 물질개발, 인체 면역조절 활성화에 미치는 영향에 집중되어, 특정 연령층에 대한 맞춤형 연구는 미흡한 실정이다(Lee et al., 2007; Yang et al., 2015). 이에, 노인의 저작기능에 도움을 줄 수 있는 자체 개발 죽에 면역력 증진 효과를 볼 수 있다고 알려진 발효사물탕 죽을 첨가하여 실험하고자 한다. 발효사물탕 죽은 당귀, 천궁, 숙지황, 백작약으로 구성되어 있으며, 한방처방 중 가장 기본적인 처방으로 갱년기 장애, 면역저하 등의 치료제로 예로부터 널리 사용된다고 알려져 있다(Lee et al., 2010; Hwang et al., 2022).

발효사물탕 죽의 구성성분 중 당귀(*Angelica gigas*)는 미나리과에 속하는 다년생 본 초인 참당귀 뿌리로 1~2년생 뿌리를 건조한 것이다(Huh et al., 2022). 당귀의 효능은 항염, 진통, 면역증강에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2009). 또한, 선행연구에 따르면, 면역세포 활성화물질의 생성조절을 통해 면역조절에 효능이 있다고 알려져 있다(Jeon and Kim, 2022).

천궁(*Cnidium officinal*)은 미나리과에 속하는 다년생 초본이고 중국, 한국, 일본에서 주로 재배된다(Choi et al., 2012). 천궁은 혈관을 확장시켜 혈액순환에 도움을 주고, 기운을 순조롭게 통하게 하여, 예로부터 다양한 질환의 예방과 치료제로 널리 사용되어 왔다(Zhou and Qu, 2009). 최근 연구에서 천궁추출물의 생리작용으로 항암, 진통, 항염(Lee et al., 2019), 항박테리아(Sim and Shin, 2014) 등으로

작용한다고 보고되고 있다.

숙지황(*Rehmanniae Radix Preparata*)은 당귀, 천궁, 작약 등과 함께 4대 한약재로 해열제, 지혈제, 빈혈, 폐결핵 등에 사용되는 중요한 한약재이다(Bae et al., 2015). 또한, 혈압조절, 조혈작용, 암세포 성장 저해 등의 만성병에 널리 쓰이고, 면역력 증가의 효능을 가지고 있다(Kim, 2011).

백작약(*Paeonia japonica*)은 작약과의 작약 속에 속하는 다년생식물로 뿌리를 건조하여 약재를 사용한다. 백작약의 주요 작용으로 항노화, 항염증, 항균작용, 항암, 면역기능 증진 등에 효과가 보고되고 있다(Lee et al., 2021; Park et al., 2001).

따라서 본 연구는 노인의 저작, 연하, 면역기능 저하 문제를 해결하기 위하여 (주)서창산업으로부터 제공받은 주원료인 닭고기 죽에 위의 기능을 가졌다고 알려진 발효사물탕 죽을 이용하여 Cyclophosphamide 유도 면역억제 동물모델에서 면역력 증진 효과가 있는지 검증하고, 면역 장기 및 체내 면역조절 관련 지표에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

발효사물탕 죽의 제조

본 연구에 사용된 발효사물탕 죽은 (주)서창산업으로부터 제공받아 진행하였다. 발효사물탕의 면역효능 활성 검증을 위해 1.0%, 0.5%, 0.25% 배합비로 면역효능 활성 검증을 시행하고, 발효사물탕의 쓴맛을 완화하는 최적의 배합비를 성장하였다. 주원료인 닭고기는 생물을 사용하였고, 발효사물탕과 배합 시 닭고기를 먼저 익힌 후 혼합하여 실험을 진행하였다. 발효사물탕 죽의 조성 비율은 천궁, 작약, 당귀, 숙지황으로 각 한약재를 1:1:1:1의 비율에 총 한약재 양에 15배의 정제수를 투입하여 1차 추출과 2차 추출을 통해 농축하였으며, *L. delbruekii*, *L. acidophilus*, *L. casei*, [0085] *S. thermophilus* 및 Yo-mix의 5가지의 균을 접종시켜 30~40℃에서 138시간 발효시켰다. 최종시료는 동결 건조된 형태로 전달받았으며, 냉장고에 보관하여 멸균증류수에 녹여 사용하였다.

실험동물

체중 33.2±1.8 g의 6 주령 수컷 ICR mouse를 (주)라온바이오(Yongin City, Gyeong-gido)로부터 구입하여 일주일간 적응 후 실험에 이용하였다. 실험동물의 사육 온도는 23±1℃, 습도 50±5%, 명암주기 12시간으로 항온, 항습이 유

지되는 사육실에서 사육하였다. 사료는 실험동물용 고품 사료(Purina, Seongnam City, Korea)를 충분히 공급하고, 식수도 제한 없이 공급하였다. 본 동물 실험에 관련된 모든 시험 과정과 절차는 대전대학교 동물 실험 위원회의 사전 심의와 윤리 규정을 준수하여 수행하였다(DJUAIRB2018-56).

실험 방법

동물군 설정 및 투여: 일주일의 순화 기간을 거친 후 평균 체중과 근접한 개체들을 선발하였으며, 무작위법을 이용하여 군당 7마리씩 6군으로 나누었다. 실험군은 정상대조군(Normal Control, 이하 N.C), Cyclophosphamide(이하 CPA) 단독 투여군(immunosuppression, 이하 I), CPA와 동결 건조된 기본죽(10% 농도, D.W) 투여군에 발효사멸탕 병행 투여 저농도군(이하 BL, 0.25% mg/kg b.w), 중농도군(이하 BM, 0.5% mg/kg b.w), 고농도군(이하 BH, 1.0% mg/kg) 6개의 군으로 설정하였다. 0.9% NaCl에 Cyclophosphamide (Sigma aldrich, Korea)를 150 mg/kg 농도로 100 µL씩 실험 시작일과 3일 후에 복강 투여로 두 번 주사하여 면역억제를 유도하였다. 시험군의 경우 10% 농도의 기본 영양죽에 저농도, 중농도, 고농도(0.25%, 0.5%, 1.0%)의 농도로 각각 동결 건조된 한약재를 첨가하여 면역억제제와 동시 투여를 진행하였고, 10 mL/kg 용량으로 총 14일간 경구 투여하였다.

장기 중량 측정: 실험 시작일과 종료일에 실험동물 체중을 측정하였으며, 시험물질 마지막 투여가 끝난 후 24시간 뒤에 isoflurane (JSK, Korea)으로 흡입마취 후 복대 동맥에서 채혈하고 면역세포의 분화가 일어나는 기관인 흉선 및 비장을 수집하였다. 각 개체의 체중에 따른 차이를 줄이기 위해 최종 희생 일의 체중에 대한 상대 중량을 산출하여 백분율(%)로 면역 장기 무게 변화를 나타내었다.

$$\text{Relative Organ Weights (\% of body weight)} = \frac{\text{Absolute organ weight}}{\text{Body weight at sacrifice}} \times 100$$

Relative organ weights of ICR mice (% Absolute Organ weight/body weight)

비장세포 분리: 실험동물의 희생 후 비장을 적출하여 주변 조직을 제거해 준 뒤 절반으로 절단하여 사용하였으며, 남은 절반의 조직은 조직병리학적 검사에 사용되었다. 비

장을 약 10 mL의 RPMI (2%, Gibco, USA)에 세척한 뒤, Petri dish에 옮겨 분쇄한 후 원심분리기(4°C, 1,700 rpm, 5분, LABOGENE 1248, Korea)를 이용하여 상층액을 제거하였다. 비장세포액에 함유되어 있는 적혈구를 제거하기 위해 RBC lysis buffer (Sigma aldrich, Korea)를 3 mL 첨가한 뒤 항온수조(37°C)에서 5분간 방치한 후 원심분리(4°C, 1,700 rpm, 5분) 하였다. 상층액을 제거한 후 침전된 비장세포에 FBS (10%, Gibco, USA)가 첨가된 RPMI-1640 (Gibco, USA) 배지액을 첨가하였다.

비장세포 증식능 측정: 분리된 비장세포를 5×10^6 Cell/mL가 되도록 조절하였다. 분리된 비장세포액을 96 well plate에 well 당 90 µL씩 가하고, 각 군당 mitogen으로 콘카나발린 A (Concanavalin A, 이하 ConA, 5 µg/mL, Sigma aldrich, Korea), 지질다당류(Lipopolysaccharide, 이하 LPS, 15 µg/mL, Sigma aldrich, Korea)를 10 µL씩 분주하고 CO₂ incubator (37°C, 5%)에서 44시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT (Gibco, USA)를 10 µL 가하고 4시간 동안 배양 후 formazan crystal 형성을 유도하였다. 이후 4°C, 1,500 rpm, 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 각 well에 150 µL의 Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 10분간 방치하였으며, ELISA reader (Multiskan GO, Thermo SCIENTIFIC, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도에서 측정하였다.

림프구 아형 검사: 림프구 아형 검사 측정을 위해 분리된 비장세포액을 1×10^6 Cell/100 µL가 되도록 조절하였다. 조절된 비장세포액에 FACS Buffer (PBS contain 1% BSA) 1 mL를 첨가한 후 원심분리(4°C, 2,000 rpm, 10분)하여 2회 세척하였다. 상층액 제거 후, 1% paraformaldehyde가 포함된 FACS buffer 200 µL를 이용해 pellet을 현탁시키고 ice에서 15분간 반응시켰다. FACS buffer (PBS contain 1% BSA) 1 mL를 이용하여 2회 세척 후, 상층액을 제거하고, pellet을 FACS buffer 500 µL에 현탁시켜 FACS tube로 이동 후 측정하였다.

면역글로불린 측정: 면역글로불린 G (Immunoglobulin G, 이하 IgG), 면역글로불린 A (Immunoglobulin A, 이하 IgA), 면역글로불린 M (Immunoglobulin M, 이하 IgM) 측정은 Mouse Immunoglobulin ELISA Kit (Cusabio Biotech., Co. Ltd Fannin St, USA)를 사용하여 실험하였다. 면역글로불린 측정을 위해 각 Well 당 Standard와 검체를 50 µL씩 분주한 뒤, HRP-conjugate를 50 µL 추가하고 잘 혼합 후 37°C에

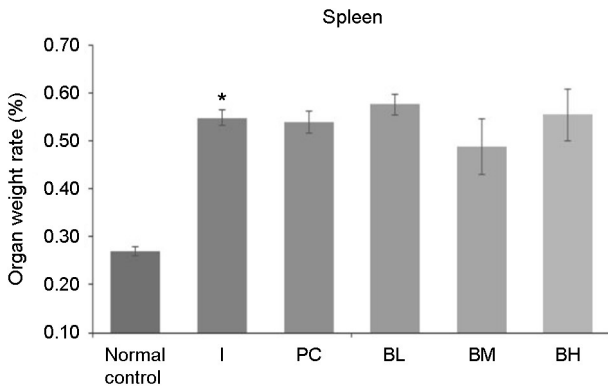


Fig. 1. Effects of fermented samultang extract on spleen weight rate changes in mouse with immunosuppression induced by cyclophosphamide. N.C: normal control, I: Cyclophosphamide induced immunosuppression, P.C: Cyclophosphamide induced immunosuppression with basic porridge 10%, B.L: Cyclophosphamide induced immunosuppression with fermented samultang extract 0.25% in basic porridge 10%, B.M: Cyclophosphamide induced immunosuppression with fermented samultang extract 0.5% in basic porridge 10%, B.H: Cyclophosphamide induced immunosuppression with fermented samultang extract 1% in basic porridge 10% in male ICR mouse. Data are shown as mean \pm SD (n=7). Data are shown as mean \pm SE (n=7). Significant difference from normal group by Student's *t*-test: * P <0.05.

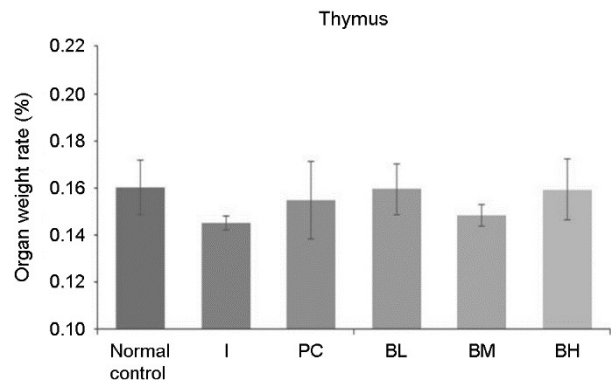


Fig. 2. Effects of fermented samultang extract on thymus weight rate changes in mouse with immunosuppression induced by cyclophosphamide. Notes on group designation at the same as Fig. 1. Data are shown as mean \pm SE (n=7).

서 60분 동안 배양하였다. 각 Well을 wash buffer를 이용해 5번 세척한 후 90 μ L의 TMB substrate를 넣고 빛이 차단된 상태에서 37 $^{\circ}$ C, 20분간 배양하였다. 마지막으로 각 Well에 50 μ L의 stop solution을 넣고 플레이트를 혼합시킨 후 ELISA reader (Multiscan GO, Thermo SCIEN TIFIC, USA)에서 450 nm의 흡광도로 측정하였다.

조직병리학적 검사: 동물 시험 종료일에 절취한 비장 및 흉선을 10% 중성 완충 포르말린에 24시간 고정하였다. 고정된 조직은 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀 포매 후, 4 μ m 두께로 연속절편 하였다. 비장 및 흉선의 일반적인 형태 변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

통계처리: 조직화학 및 면역조직화학 결과를 정량화하기 위해 *image J program* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 영상분석을 시행하였다. 모든 실험 결과는 평균과 표준오차로 나타내고, 각 군 간의 차이는 SPSS v.20 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 사용하여 Student's *t*-test로 분석하였으며, P <0.05

일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

면역 장기 중량 측정

발효사물탕을 함유한 기본죽 투여에 의한 면역력 개선 효과를 평가하기 위해 동물의 비장 및 흉선 조직에서 장기 중량을 측정하였다. 비장의 경우 정상대조군 $0.27 \pm 0.02\%$ 와 비교하였을 때, 면역억제군 $0.55 \pm 0.04\%$ 에서 유의하게 증가(P <0.05)하였다(Fig. 1). 반면, 시험물질 투여군에서는 농도에 따라 감소하였으며 특히 BM군에서 $0.49 \pm 0.14\%$ 로 감소하는 것을 관찰하였으나, 유의성은 나타나지 않았다. 흉선의 경우 정상대조군 $0.16 \pm 0.03\%$ 와 비교하였을 때, 면역억제군 $0.15 \pm 0.01\%$ 로 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. CPA와 발효사물탕 죽 투여군을 비교하였을 때 흉선의 무게가 전체적으로 증가하였지만 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 2).

비장세포 증식능 측정

발효사물탕을 함유한 기본죽 투여에 의한 면역력 개선 효과를 평가하기 위해 동물의 비장세포에서 B 세포 및 T 세포 증식능을 측정하였다. B 세포 분열촉진인자인 LPS를 이용한 B 세포 증식능을 측정된 결과, 정상대조군 6.08 ± 7.80 pg/mL과 비교하였을 때, 면역억제군에서 0.91 ± 0.68 pg/mL로 현저하게 감소하였으나, 유의성은 나타나지 않았다. 면역억제군과 비교하였을 때, 발효사물탕 죽을 투여한 모든 군에서 농도 의존적으로 증가하는 효

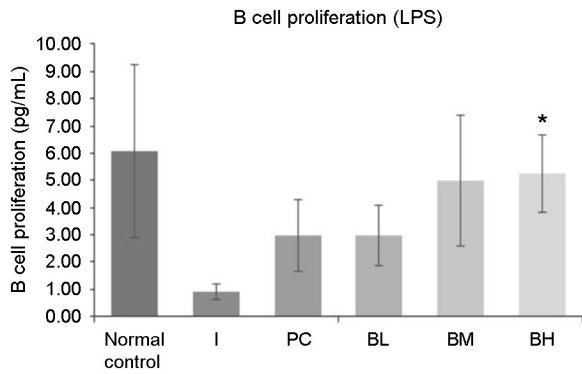


Fig. 3. Effects of fermented samultangextracton B cell proliferation changes in mouse with immunosuppression induced by cyclophosphamide. After MTT assay, it was measured at 570 nm using an ELISA Reader. Notes on group designation at the same as Fig. 2. Data are shown as mean \pm SE (n=7). Significant difference from I group by Student's *t*-test: **P*<0.05.

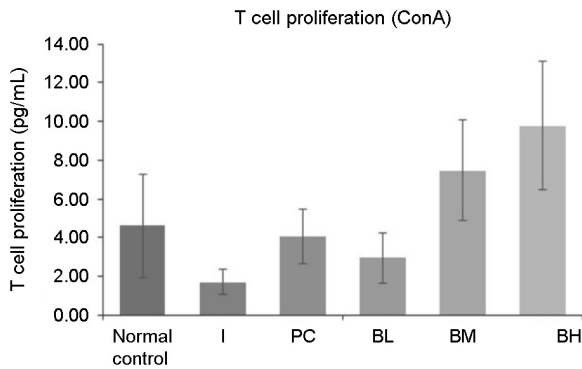


Fig. 4. Effects of fermented samultangextracton T cell proliferation changes in mouse with immunosuppression induced by cyclophosphamide. Notes on group designation at the same as Fig. 2. Data are shown as mean \pm SE (n=7).

과를 보였으며, 특히 BH군에서 5.24 ± 3.47 pg/mL로 유의하게 증가(*P*<0.05)하였다(Fig. 3). 또한, 기본죽을 투여했을 때보다, 발효사물탕 죽을 중농도, 고농도로 투여한 군에서 정상대조군과 유사할 정도로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. T 세포 분열촉진인자인 ConA를 이용한 T 세포 증식능을 측정한 결과, 정상대조군 4.62 ± 6.55 pg/mL과 비교하였을 때, 면역억제군에서 1.68 ± 1.56 pg/mL으로 현저하게 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 면역억제군과 비교하였을 때, 발효사물탕을 투여한 군에서 모두 농도 의존적으로 증가하는 효과를 보였으나, 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 4).

Table 1. Effects of fermented samultangextracton CD19, CD3, CD56 changes in mouse with immunosuppression induced by cyclophosphamide

Group	CD3	CD19	CD56
NC	540.7 \pm 70.5	1245.2 \pm 233.3	34.3 \pm 6.5
I	390.13 \pm 9.07	785.2 \pm 98.4	24.5 \pm 2.8
PC	401.0 \pm 18.0	794.3 \pm 217.7	30.4 \pm 2.3
BL	451.9 \pm 62.3	864.8 \pm 126.0	28.3 \pm 2.0
BM	451.9 \pm 62.3	751.2 \pm 39.8	28.1 \pm 0.7
BH	537.3 \pm 47.2*	996.4 \pm 77.8	36.3 \pm 3.2*

Notes on group designation at the same as Fig. 2. Data are shown as mean \pm SE (n=7). Significant difference from I group by Student's *t*-test: **P*<0.05

림프구 아형 검사

발효사물탕을 함유한 기본죽 투여에 의한 면역력 개선 효과를 평가하기 위해 비장세포에서 림프구 아형 검사를 진행하였다. B 세포를 표적 마커 CD19, T 세포를 보기 위한 CD3, NK 세포를 보기 위한 CD56을 측정하였다(Table 1). CD19를 측정한 결과, 정상대조군 1245.2 ± 571.5 ng/mL과 비교하였을 때, 면역억제군에서 785.2 ± 241.0 ng/mL로 감소하였고, 유의성은 나타나지 않았다. 면역억제군과 비교하였을 때, 시험물질 투여군에서 농도 의존적으로 증가하였으며, BH군에서 996.4 ± 190.5 ng/mL로 증가하였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. CD3을 측정한 결과, 정상대조군 570 ± 172.8 ng/mL와 비교하였을 때, 면역억제군에서 390.1 ± 22.2 ng/mL로 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 면역억제군과 비교하였을 때, 시험물질 투여군에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 BH군에서 537.3 ± 115.7 ng/mL로 유의하게 증가(*P*<0.05)하였다. CD56을 측정한 결과 정상대조군 34.3 ± 15.8 ng/mL과 비교하였을 때, 면역억제군에서 24.5 ± 6.8 ng/mL로 감소하였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 면역억제군과 시험물질 투여군을 비교하였을 때, 농도 의존적으로 증가하였고, 특히 BH군에서 36.3 ± 8.0 ng/mL로 유의하게 증가(*P*<0.05)하였다.

면역글로불린 검사

발효사물탕을 함유한 기본죽 투여에 의한 면역력 개선 효과를 평가하기 위해 동물의 혈청에서 면역글로불린 검사를 진행하였다(Table 2). IgA를 측정한 결과, 정상대조군 480 ± 131 ng/mL과 비교하였을 때, 면역억제군에서 48 ± 69 ng/mL로 현저하게 감소하였으며 유의한 결과를 나타

Table 2. Effects of fermented samultang extracton immunoglobulin A, immunoglobulin M, immunoglobulin G changes in mouse with immunosuppression induced by cyclophosphamide

Group	IgA	IgG	IgM
NC	480.3±53.5	1258.1±180.6	189.7±28.1
I	47.6±28.2 [#]	645.6±85.2	176.6±37.7 [#]
PC	144±90.7	490.8±165.6	98.6±56.3
BL	115.9±44.5	713.8±97.7	146.9±58.4
BM	372.1±70.6 [*]	785.5±161.7	166.5±31.7
BH	220.1±86.6 [*]	788.2±186.5	192.4±42.5

Notes on group designation at the same as Fig. 2. Data are shown as mean ± SE (n=7). Significant difference from Normal group by Student's *t*-test: [#]*P*<0.05. Significant difference from I group by Student's *t*-test: ^{*}*P*<0.05

내었다(*P*<0.05). 면역억제군과 시험물질 투여군을 비교하였을 때, BM군 372±173 ng/mL, BH군 220±212 ng/mL로 유의하게 증가(*P*<0.05)하였으며, 발효사물탕 죽 투여군 모두 면역억제군과 비교하였을 때 20% 이상 증가하는 결과를 보였다(Keyt et al., 2020). IgM을 측정된 결과, 정상대조군 190±69 ng/mL과 유의한 차이는 나타나지 않았다. 면역억제군과 비교하였을 때, 시험물질 투여군에서 증가하였지만, 유의성은 나타나지 않았다. IgG를 측정된 결과, 정상대조군 1258±442 ng/mL과 비교하였을 때, 면역억제군에서 646±209 ng/mL로 현저하게 감소하였으며, 비록 유의성은 나타나지 않았으나 면역억제제를 투여한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였다. 반면, 기본죽을 투여하였을 때 감소된 IgG가 증가하지 않았으나, 발효사물탕 죽을 투여한 모든 군에서 유의성은 나타나지 않았지만 증가하는 경향을 나타내었다.

조직병리학적 검사

Haematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 통하여 비장 및 흉선의 병리학적 변화를 관찰하였다. 정상대조군의 비장조직은 중심 정맥(central vein, 이하 CA) 주변으로 백색수질이 고르게 분포되어 있으며, 림프소절(lymph nodule, 이하 LN)이 가장자리 구역에 둘러싸여 있어 적색수질과의 경계가 명확하게 구분된 것으로 관찰되었다(Park et al., 2001). 백색 수질의 비율을 측정하기 위해 현미경을 이용하여 200배의 비율로 촬영 후 *image j program*을 이용하여 비장의 전체 면적 대비 백색수질의 면적을 측정하여 비율로 계산하였다. 면역억제군에서 백색 수질의 비율이 현저하게 감소한 반면 면역억제군 19.4±4.9%와 비교하였을 때,

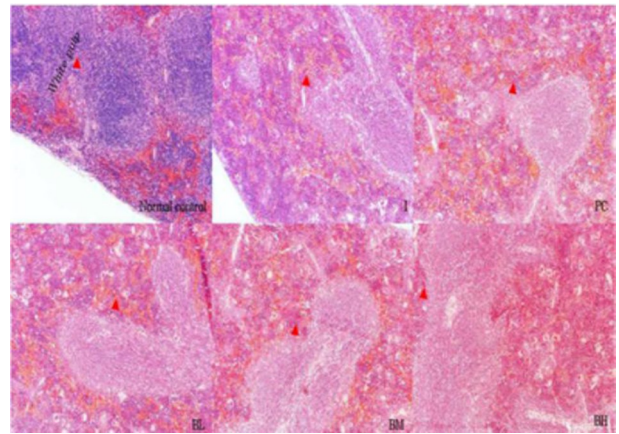


Fig. 5. Effect of fermented samultang extracton spleen histological changes by H&E staining in cyclophosphamide induced immunosuppression in mouse (×100). Notes on group designation at the same as Fig. 2.

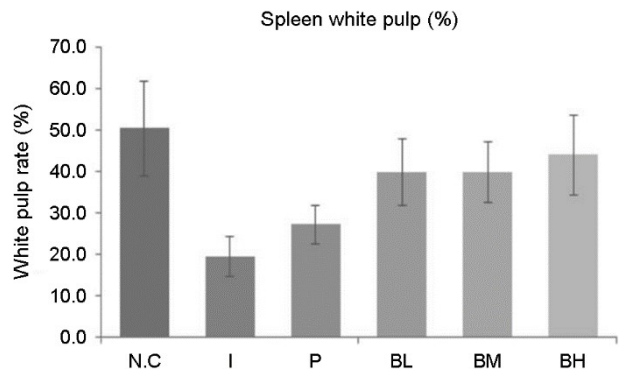


Fig. 6. Effects of fermented samultang extracton white pulp rate changes in mouse with immunosuppression induced by cyclophosphamide. Notes on group designation at the same as Fig. 1. Data are shown as mean ± SE (n=7).

시험물질 투여군에서 백색수질의 비율이 농도 의존적으로 증가하였으며 특히 BM 39.8±7.4%, BH 44.0±9.6%에서 유의하게 증가하여 대조군에서 관찰되던 백색수질의 붕괴는 거의 확인되지 않았다(*P*<0.05) (Fig 5, 6). 다음으로, 흉선에서 수질이 차지하는 면적 비율을 측정하기 위해 현미경을 이용하여 200배의 비율로 촬영 후 *image j program*을 이용하여 흉선의 전체 면적 대비 수질의 면적을 측정하여 비율로 계산하였다. 정상대조군에서는 위와 같은 조직병리학적 소견은 나타나지 않는 반면, 면역억제군에서 피질 내 TBM의 증가, 수질이 차지하는 면적의 비율이 유의하게 감소(*P*<0.05)하였으며, 수질과 피질의 경계가 불명확한 결과를 보였다. 또한 면역억제군과 비교하였을 때,

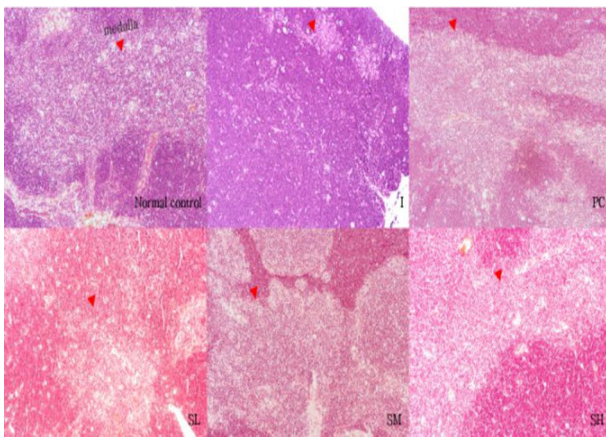


Fig. 7. Effect of fermented samultang extract on thymus histological changes by H&E staining in cyclophosphamide induced immunosuppression in mouse ($\times 100$). Notes on group designation at the same as Fig. 2.

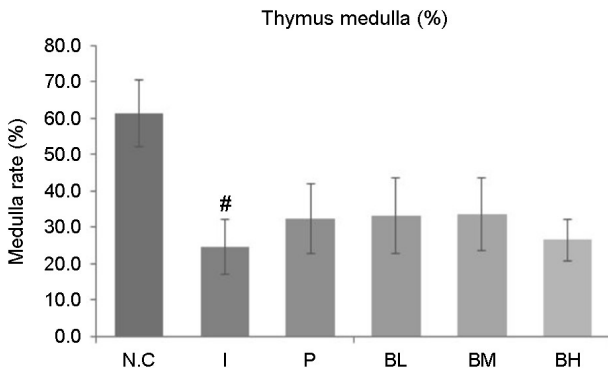


Fig. 8. Effects of fermented samultang extract on Thymus meddulla rate changes in mouse with immunosuppression induced by cyclophosphamide. Notes on group designation at the same as Fig. 2. Data are shown as mean \pm SE ($n=7$). Significant difference from normal group by Student's *t*-test: # $P<0.05$.

발효사물탕 죽 투여군에서 수질이 차지하는 비율이 증가하였으며, 유의한 차이는 나타나지 않았으나(Fig. 7, 8) 면역억제군에서 보였던 유의한 소견들이 농도 의존적으로 개선되는 효과를 관찰할 수 있었다.

고 찰

본 연구는 발효사물탕이 함유된 죽의 면역활성증진 효과를 확인하기 위해 CPA로 유발한 면역억제 동물모델을 이용하여 연구하였다. 일반적으로 생체 내 면역기능 측정 기준으로 인지되는 흉선 미 비장 지수는 식이 성분에 의

해 유의적인 영향을 받는다고 알려져 있다. 식이로 인한 체내 측정치 차이는 부분적으로 림프구 생성 능력의 차이를 초래하고, 이것은 특정 질환 감염 시 더욱 큰 영향을 받는 것으로 해석되고 있다(Cho et al., 2013). 생체 내 면역기능 측정 기준으로 인지되는 흉선 및 비장의 무게를 측정하였을 때, Kim 등의 보고와 같이 CPA 투여군의 흉선중량은 감소하였고, 비장의 중량은 면역력 저하에 따른 보호작용으로 증가하는 것을 관찰하였다(Kim, 2020). 반면, 발효사물탕 죽 중농도를 투여한 군에서 비장 무게가 가장 크게 감소하였으며, 이는 일반 건강죽을 섭취한 양성대조군 보다 크게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 주요 장기 무게의 변화는 발효사물탕이 면역억제제인 CPA로 인해 유발된 면역력 저하 반응을 억제하여 면역증진 작용에 영향을 끼친 것으로 사료된다(Kang, 2014). 비장 내에 존재하는 T, B 림프구를 측정하였을 때, CPA 투여로 인해 감소되는 것을 확인하였으며, 발효사물탕 죽을 투여하였을 때 통계학적으로 유의하지 않은 부분도 있으나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 다음으로 발효사물탕 죽에 의한 면역력 개선 효과를 평가하기 위해 동물의 비장세포에서 B, T 세포 증식능을 측정하였다. 비장은 이차 림프조직으로 작용하여 혈액 속 항원을 제거하고 면역세포를 활성화시켜 외부 항원에 대해 적응 면역반응을 시작하는 주요 장기이다. CPA 대사체들은 비장세포의 DNA를 akylation 시켜, T, B 림프구에 의한 면역반응을 억제시킨다고 알려져 있다(Choi et al., 2019). CPA로 면역억제를 유도하였을 때, T, B 림프구의 현저한 감소가 나타났으며, 이는 CPA 투여에 의한 T와 B 림프구의 증식능을 감소시킨 것은 림프구의 mitogen 유도성 증식 반응을 확인한 결과 mitogen에 반응한 림프구가 낮게 나타났다는 선행연구 결과와 일치하였다(Shin et al., 1996). 반면, 발효사물탕 죽을 투여한 모든 군에서 농도 의존적으로 증가하는 효과를 보였으며 특히, 발효사물탕 죽 중, 고농도 투여군에서는 기본죽을 투여한 양성대조군과 비교하였을 때, 약 2배 이상 증가하는 결과를 나타내었다. 발효사물탕 죽 투여군의 T 세포와 B 세포 증식은 비장 내 면역세포 활성화로 해석되고, 발효사물탕이 비장세포의 증식에도 효과가 있음을 증명한 Lee 등의 연구결과와 일치하였다(Lee et al., 2009). 이 외에도 발효사물탕을 구성하는 성분인 백작약 추출물의 조다당분획 물질이 T 세포에 영향을 주어 cytokine을 유발하고 이들이 대식세포와 B 세포를 활성화시켜 면역조절물질로 사용된다는 Park 등의 연구에 따라, T, B 세포 활성화에 기여했을 것으로 사료된

다(Park et al., 2001). 또한, 발효사물탕 죽을 투여하여 증가된 p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 발현이 감소되었다는 선행연구 결과로 비추어 보았을 때, 발효사물탕 죽이 mitogen의 조절에 관여하여 나타난 결과로 보여진다(Kim et al., 2014). 비장세포 내 림프구 아형의 분포 변화를 확인하기 위해, B, T 림프구와 NK 세포를 CD19, CD3, CD56 marker를 이용해 측정된 결과 정상대조군에 비해 모든 면역억제유도군에서 감소하였으며, 이는 R. Huang 등의 연구에서 CPA 투여로 인해 CD19, CD3의 수치가 감소한 것과 동일한 결과를 나타내었다(Huang et al., 2013). 반면, 면역억제군과 발효사물탕 투여군을 비교하였을 때 발효사물탕 죽 투여군에서 농도 의존적으로 증가하였다. 특히, CD3과 CD56에서 BH군이 유의하게 증가하였다. 뿐만 아니라, 발효사물탕 죽 고농도 투여군에서 기본죽을 투여한 양성대조군보다 CD19, CD3, CD56의 발현이 증가하였으며, 정상대조군과 유사하거나 약간 높게 측정된 것으로 분석되었다. 또한, 동물의 혈청에서 면역글로불린을 IgG, IgA, IgM의 발현을 측정하였다. IgA는 바이러스가 호흡기 표피세포에 붙은 다음 표피층을 통과하여 세포 내로 침입한 뒤 번식하게 되는 과정이 진행되는 것을 막아주는 역할을 한다고 알려져 있으며(Patricia and Woof, 2019), IgG는 혈청에서 가장 풍부한 항체로서 면역글로불린의 80%를 차지하고 있다(Papadea and Check, 1989)고 알려져 있다. 측정결과, IgA와 IgG에서 대조군에 비해 면역억제군에서 유의하게 감소하였고, IgA의 경우 면역억제군에 비해 BM군과 BH군에서 유의하게 증가하였으며, 이는 기본죽을 투여한 양성대조군보다 2배 가까이 증가하는 경향을 나타내었다. 마지막으로, 비장과 흉선의 병리학적 변화를 관찰하였을 때, 비장조직은 CA 주변으로 백색수질이 고르게 분포되어 있고, LN이 가장자리에 둘러싸여 있어 적색수질과 경계가 명확하게 구분되었다 면역억제군은 CPA로 인한 백색수질 손상으로 CA와 적색수질과의 경계가 불명확하였는데, 일반적으로 CPA를 처리하게 되면 비장의 백색수질이 손상되어 중심정맥, 적색수질과의 경계가 불명확하다고 보고된 결과와 같은 소견을 보였다(Chung et al., 1978). 반면, 발효사물탕 죽 투여군은 백색수질의 비율이 통계학적으로 유의하지 않은 부분도 있으나 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, CPA를 단독 투여한 대조군에서 관찰된 백색수질의 붕괴는 관찰되지 않았다. 이는 발효사물탕의 구성물질인 당귀 추출물을 투여하였을 때, 비장 조직의 수질간의 경계가 명확하게 구분되며 조직 내 가장자리 구역이 선명하게 관찰되

며 적색수질의 세포 응축 현상이 호전된다는 Seo와 Kim의 보고와 일치하는 경향을 나타내었다(Seo and Kim, 2022). 또 다른 주요 면역 장기 중 하나인 흉선의 피질은 시험물질에 의한 직접적 영향 또는 스트레스에 의해 세포 수 감소 병변이 나타날 수 있으며, 림프구 자멸사 증가, 피질 내 Tingible Body Macrophages (TBM)의 증가, 피질과 수질 사이 경계 감소를 동반하게 된다. 흉선의 경우 정상대조군에서는 림프구 자멸, TBM 증가, 피질과 수질의 경계 감소 등과 같은 조직병리학적 소견은 보이지 않았고, 면역억제군은 피질 내 TBM 증가, 수질면적 비율 감소, 수질과 피질의 경계가 불분명한 소견을 보였다. 이러한 원인은 면역억제제로 인한 흉선세포의 세포사멸을 통한 흉선위축으로 사료된다(Lee, 2014). 반면 면역억제군에 비해 발효사물탕 죽 투여군에서 수질면적 비율이 증가하였지만, 유의한 차이는 없었다. 본 연구를 통해 자체 개발한 발효사물탕 죽이 면역활성증진에 효과가 있음을 확인하였고, 고령화로 인한 노인의 저작운동 저하로 발생하는 영양불균형 및 면역력 저하에 도움을 줄 것으로 생각된다. 따라서, 발효사물탕 죽은 면역증진과 관련된 기능성 소재로 활용을 기대할 수 있고, 식품개발의 소재로써 활용할 경우 고령화 시대의 사회적 비용 절감과 삶의 질 개선에도 많은 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

ACKNOWLEDGEMENT

None.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Bae HR, Lee SK, Whang IJ, Kang JM, Lee JH. Discrimination of geographic origin by trace elements contents in rehmannia radix preparat using x-ray fluorescence analysis. *J Appl Biol Chem.* 2015. 58: 345-348.
- Bang HM, Yang EJ. Nutritional status and health risks of low income elderly women in Gwangju Area. *Korean J Nutr.* 2008. 41: 65-76.
- Cho CW, Lee YK, Kim YC, Han CJ, Shin KS. Immunomodulatory effects of polysaccharides derived from persimmon leaves on cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Korean J Food Sci Technol.* 2013. 45: 636-641.

- Choi JH, Lee EB, Park YG, Lee HK, Jang HH. Aged doraji (*Platycodon grandiflorum*) ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Kor J Pharmacogn.* 2019. 50: 219-225.
- Choi MI, Mun SJ. Relationship among dietary intake ability, oral health status, and nutritional status in the elderly. *Korean J Asisted Reproduction Gen.* 2018. 6: 29-40.
- Choi SW, Kim EO, Leem HH, Kim JK. Anti-inflammatory effects of volatile flavor extracts from *cnidium officinale* and *angelica gigas*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012. 41: 1057-1065.
- Chung HT, Ha TY, Chung DK. Histological changes of mouse spleen and lymph node by cyclophosphamide. *J Kor Soc Microbiol.* 1978. 13: 55-62.
- Huang R, Zhang J, Liu Y, Hao Y, Yang C. Immunomodulatory effects of polysaccharopeptide in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide. *Molecular Medicine Reports.* 2013. 8: 669-675.
- Huh J, Park HY, Kim EJ, Kim EY, Sohn YJ. Effect of *angelicae gigantis radix* for inflammatory response in hacat cells. *Kor J Herbol.* 2022. 37: 9-19.
- Hwang SH, Park SY, Shin YK. Evaluation of the efficacy of modified samultang in female menopausal animal models using ovarian resection rats. *Journal of the Korea Convergence Society.* 2022. 13: 573-582.
- Jeon YD, Kim SJ. The regulatory effect of *angelica gigas nakai* on immune enhancement and cytokine production *in vivo* and *in vitro*. *Korean J Plant Res.* 2022. 35: 411-416.
- Kang MS. Understanding traditional veterinary medicine (10): Samultang. *J Korean Vet Med Assoc.* 2014. 50: 706-708.
- Keyt BA, Baliga R, Sinclair AM, Carroll SF, Peterson MS. Structure, function, and therapeutic use of IgM antibodies. *Antibodies.* 2020. 9: 53.
- Kim HR. Immunomodulating and anti-diabetic activities of the extract of *rehmanniae radix*, master's thesis, Chungnam National University Graduate School, Daejeon, Korea. 2011. pp. 3-4.
- Kim SJ, Joo NM. Development of easily chewable and swallowable pan-fried flat fish for elderly. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015: 28: 153-159.
- Kim YK, Hyun KY, Park MK, Lee MK. Role of samultang in formalin-induced orofacial pain. *J Indus Microbiol.* 2014. 15: 5594-5601.
- Kim YM. A Spleen size measured by ultrasound in 20's normal adults. *J Korean Soc Radiol.* 2020. 14: 337-343.
- Lee HY, Ha HK, Jung DY, Lee NH, Shin HK. Immuno stimulatory activities of samul-tang, sagunja-tang, pamul-tang and sipjeondaebo-tang *in vitro*. *J of Oriental Neuropsychiatry.* 2010. 21: 41-51.
- Lee JE. Nutritional status of the aged and establishment of their food and nutrition guideline, master's thesis, Kyunghee University Graduate School of Industrial Information, Seoul, Korea. 2008. pp. 9-10.
- Lee JH. Ghrelin attenuates dexamethasone-induced T-cell apoptosis by suppression of the glucocorticoid receptor. *J Life Sci.* 2014. 24: 1356-1363.
- Lee JJ, Kim AR, Seo YN, Lee MY. Comparison of physicochemical composition of three species of genus *angelica*. *Korean J Food Preserv.* 2009. 16: 94-100.
- Lee KY, Kim JH, Kim EY, Sohn YJ. Water extract of *cnidii rhizoma* suppresses rankl-induced osteoclastogenesis in raw 264.7 cell by inhibiting NFATc1/c-Fos signaling and prevents ovariectomized bone loss in SD-rat. *BMC Complement Altern Med.* 2019. 19: 207-219.
- Lee SH, Shin MR, Lee JH, Roh SS. Effects of water extract of *paeoniae radix alba* on a thioacetamide induced acute liver injury rat model. *J Nutr Health.* 2021. 54: 224-237.
- Lee YS, Lee GH, Kwon YK, Park JH, Shin SW. Immunomodulatory effect of aqueous extracted *zingiberis rhizoma* on cyclophosphamide - induced immune suppression. *Korean J Ori Med Physiol Pathol.* 2007. 21: 485-490.
- Mumma RD, Quinton K. Effect of masticatory efficiency on the occurrence of gastric distress. *J Dent Res.* 1970. 49: 69-74.
- Oh KG, Kim YJ, Kweon SH, et al. Ministry of health and welfare, korea centers for disease control and prevention: korea health statistics 2020: Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES VIII-1). korea centers for disease control and prevention. Cheongju. 2022.
- Papadea C, Check IJ. Human immunoglobulin g and immunoglobulin g subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 1989. 27: 27-58.
- Park HR, Ham YH, Yee ST, Paik SG, Jo SK. Characteristics of B cell proliferation by polysaccharide fraction of *Paeonia japonica miyabe*. *Immune Network.* 2001. 1: 126-134.
- Park JS, Lee CH. Comparison of clinical characteristics of elderly rheumatoid arthritis by age group. *Medical Journal of National Health Insurance Service Ilsan Hospital.* 2017. 16: 24-27.
- Patrícia SP, Woof JM, IgA: structure, Function, and Developability. *Antibodies.* 2019. 8: 57.
- Seo BC, Kim SJ. The Effect of *Angelica gigas Nakai* on Immune

Enhancement in Cyclophosphamide-induced Immune-suppressed Mice. *J Biomed Sci Letters*. 2022. 28: 120-126.

Shin DB, Park YH, Nam HM, Moon JS, Joo YS. Characterization of immunosuppressive factors in the mastitis - infected mammary gland of non - lactating cows - 2. Suppression of mitogen - induced lymphoblastogenesis by neutrophils from peripheral blood and mammary gland secretion. *Korean J Vet Res*. 1996. 36: 647-655.

Sim Y, Shin S. Antibacterial activities of the essential oil from the leaves and rhizomes of *Cnidium officinale* Makino. *J Essent Oil Res*. 2014. 26: 452-457.

Song JS. Diagnosis and treatment of rheumatic diseases important to the elderly. *Korean J Clin Geri*. 2021. 22: 1-8.

Yang JW, Jeon HL, You YH, Kim JY, Choi HK. Citrus ethanol extracts promotes innate immune response by activating NF-

κB. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2015. 44: 1256-1263.

Zhou J, Qu F. Treating gynaecological disorders with traditional chinese medicine: A Review. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2009. 6: 494-517.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.3.168>

Cite this article as: Oh JH, Baek SH, Cho HJ, Hwang SY. Immunoactivity-Enhancing Effect of Fermented Samultang Porridge in an Animal Model of Cyclophosphamide-Induced Immunodeficiency. *Biomedical Science Letters*. 2023. 29: 168-177.