

프로폴리스 농축액과 프로폴리스와 습식사료 혼합물 투여에 따른 비글견의 면역 반응 비교 분석

조혜진*

질병관리청 국립보건연구원 신종바이러스매개체연구과

Comparison of immune response in beagles fed propolis concentrate and propolis/wet food mixture

Hyejean Cho*

Division of Emerging Virus & Vector Research, Korea National Institute of Health, Korea Disease Control and Prevention Agency, Cheongju 28159, Korea

Received September 23, 2024
Accepted September 24, 2024

Corresponding author:

Hyejean Cho

E-mail: hcho21@snu.ac.kr

https://orcid.org/0009-0000-9461-2013

This study aimed to assess and compare the immune response in beagle dogs following the oral administration of a 5% propolis liquid concentrate and a 1:1 mixture of propolis and wet pet food. To assess the immune response, cell counting kit assays, cytokine enzyme-linked immunosorbent assay for TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-1 beta, and flow cytometry were conducted. Propolis was administered at a concentration of 5% and a dosage of 20 g, with the beagles monitored over 8 weeks. Three beagles served as controls, while four beagles each were assigned to the propolis-only group and the propolis and feed mixture group. The results demonstrated that, regardless of its form, propolis enhanced immune responses in beagles. These findings suggest that administering of a mixture of propolis and wet pet food may increase the palatability of propolis for beagle dogs while maintaining its immune-enhancing effects.

Key Words: Propolis, Beagle, Immune response, Cytokine, Safety

서론

프로폴리스는 항염증, 항산화, 면역 조절 등의 다양한 생물학적 특성 덕분에 의학 및 수의학 분야에서 활용 범위가 넓어지고 있다(Bhatti 등, 2024). 수의학계에서도 프로폴리스의 항균, 항염증, 항산화 효과로, 고양이, 개 상처 치료에 유의성 있는 결과를 보임으로써 활용 범위가 확대되고 있다(Svetikiene 등, 2024). 현재 개발 및 출시되고 있는 프로폴리스 제제 중에서 이 연구에서 사용한 액상 프로폴리스 농축액은 섭취에 따른 생체 흡수율이 가장 높아 효율적이며, 투여 용량을 조절하기 쉽고, 제형의 특성상 추가 가공 과정이 거의 필요하기 때문에 생산 비용이 상대적으로 낮은 장점이 있다(Kubiliene 등, 2015; da Rosa 등, 2022). 그럼에도 불구하고, 특유의 강렬한 향과 맛으

로 다른 식품 등에 첨가하기가 쉽지 않고 기호성 역시 떨어질 수 있다는 단점이 있다. 따라서 프로폴리스 관련 제품의 개발과 그 활용도를 높이기 위해서는 프로폴리스의 투여 방법과 제형 개발에 대한 연구가 필요하다.

본 연구는 반려동물 중 가장 오랜 역사와 비중을 차지하고 있는 반려견을 대상으로 하여 이들의 건강과 복지를 증진시키기 위한 개선된 프로폴리스의 투여 방법을 모색하고자 하였다 (Glausiusz, 2021). 이를 위하여 2개 실험군의 비글견을 대상으로 5% 농도의 프로폴리스 농축액과 프로폴리스와 시판 습식 사료를 1:1로 혼합한 혼합물을 각각 8주간 투여하면서 해당 비글견의 면역반응을 비교 분석하였다. 이 연구를 통하여 프로폴리스 단독 투여군과 프로폴리스/습식 사료 혼합 투여군간 면역반응에 차이가 있는지의 여부 확인을 통해, 프로폴리스 농축액을

반려견용 식품 첨가제로 활용할 수 있는지 여부까지 평가하고자 하였다. 이 연구 결과는 프로폴리스 단독 투여에 따른 기호성 문제 해결 방안과 프로폴리스 함유 건강 보조제품 개발을 촉진하는데 있어 중요한 기초자료를 제공해줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

실험물질

본 실험에서는 농도 5%의 프로폴리스 농축액을 아마미스 (Seoul, South Korea)로부터 공급받아 사용하였다. 해당 농축액은 특유의 강렬한 냄새를 가지는 검은색 용액으로 제조사의 권고대로 실온 보관하였다. 시판 애견 사료는 국내에서 가장 쉽게 구할 수 있는 제품인 Cesar Wet Dog Food (Mars, Inc., McLean, VA, USA)를 구입하여 사용하였다.

실험동물

본 실험을 위하여 7~20개월령의 비글견 11두(암컷 7두 및 수컷 4두)를 국내 실험동물 판매업체(Raon Bio Animal, Inc., Yongin, Korea)로부터 구입하였다. 해당 비글견들은 디스토펙퍼, 파보바이러스, 코로나 바이러스 등에 대한 필수 백신을 접종하고 중성화를 마친 상태였으며, 평균 체중은 7~13 kg이었다. 시험 전에 기본 신체검사, 혈액검사, 혈청 생화학검사, 흉부 및 복부 X-ray 검사를 실시한 결과, 별다른 이상이 확인되지 않았다. 모든 동물 실험은 서울대학교 동물 실험 윤리 위원회(IACUC)의 승인(SNU-190102-2)을 받아 진행하였다.

사육환경

실험 당시 모든 비글견은 일정한 온도(23~25℃) 및 습도(50 ± 10%)가 유지되며, 정수가 자동 급수되는 케이지에 사육하였으며, 케이지당 비글견 1두씩 배정하였다. 케이지가 설치된 동물 사육실은 인공조명으로 12시간 주기로 일정한 시간에 점등과 소등을 실시하였다. 또한, 실험 비글견들은 매일 약 3시간의 야외활동을 시킴으로써 동물 복지를 준수하였고, 적정량의 시판 견식 사료를 매일 2회 제공하였다.

실험설계

본 실험을 위하여 3두로 구성된 1개 대조군과 각 4두로 구

성된 2개 실험군을 포함한 총 3개 군으로 비글견을 구분하였다. 실험군은 농축액 프로폴리스 단독투여군과 농축액 프로폴리스와 시판용 습식사료(Cesar Wet Dog Food (Mars, Inc., McLean, VA, USA)를 1:1 비율로 배합한 프로폴리스/사료 혼합 투여군으로 구분하였다. 2개 실험군에는 각각 프로폴리스와 프로폴리스/사료 혼합물을 총 8주간에 걸쳐 매일 1회에 20 g씩 동일한 시간에 경구 투여하였으며, 투여 전과 투여 4주 후 및 투여 8주 후에 혈액을 채취하여 분석하였다.

말초혈액단핵세포(PBMC, peripheral blood mononuclear cells)의 분리

비글견의 혈액시료는 프로폴리스와 프로폴리스/사료 혼합물의 경구 투여 전인 0주차, 투여 4주차 및 8주차에 12시간 동안 절식 후, 경정맥에서 채혈하였다. 채취된 혈액의 양은 각 3 mL 씩이었으며, 혈액시료는 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)가 처리된 튜브에 옮겨 분석실로 이동하였다. PBMC를 분리하기 위해 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Illinois, USA) 5 mL를 15 mL 튜브에 분주하였다. 2.5 mL의 혈액과 동일한 양의 PBS를 혼합하여, Ficoll-Paque 층 위에 천천히 섞이지 않도록 조심스럽게 띄웠다. 그 후, 2000 rpm (400~500 g)에서 30분간 원심분리를 진행하여 단핵세포가 Ficoll 층 위에 뜨도록 하였다. 원심분리 후, PBMC가 있는 층을 조심스럽게 수집해, PBMC는 5 mL의 PBS에 부유한 다음, 1500 rpm (255 g)에서 15분간 원심분리하여 세척하였다. 상층액은 제거하고, 수집된 PBMC는 RPMI-1640 배지(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)와 10% FBS (PAN Biotech, Germany), 1% P/S (penicillin/streptomycin, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)와 혼합하여 배양하였다.

Mitogen (IL-2, LPS)을 이용한 PBMC 자극

분리된 PBMC와 Media (RPMI-1640, 10% FBS, 1% P/S)를 혼합하여 준비된 96well plate (SPL Life science company, Pocheon, Gyeonggi-do, Korea)에 각 well 당 100 uL씩 seeding하였다. 대조군, 프로폴리스 단독 투여군 및 프로폴리스/사료 혼합 투여군의 PBMC에 각각 T세포의 증식을 자극하기 위해, 농도 10 ng/mL의 canine interleukin-2 (R&D systems company, Minneapolis, Minnesota, USA)와 B세포 증식 자극을 위해 농도 50 ng/mL의 LPS, lipopolysaccharides (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 100 uL씩 각 well에

첨가하여 37°C에 CO₂가 공급되는 습윤 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다.

림프구 증식능 측정(CCK)

배양 후, D-PLUS CCK Cell viability assay kit (Dongin biotech company, Seoul, Korea)를 이용하여 제공된 프로토콜에 따라, CCK 시약을 배양된 세포와 1:10의 비율로 첨가 후 잘 섞어, 4시간 동안 37°C에 CO₂가 공급되는 습윤 인큐베이터에서 추가로 배양한 뒤 Microplate reader (Thermo Fisher Scientific company, Massachusetts, USA)에서 흡광도 450 nm로 mitogen (IL-2, LPS)으로 자극한 PBMC 세포의 증식능과 생존율을 측정하였다.

Cytokine 분비량 측정을 위한 ELISA

배양된 PBMC를 Mitogen (IL-2, LPS)으로 자극 후, 시판 ELISA 키트(R&D systems company Minneapolis, Minnesota, USA)를 이용하여 사이토카인 TNF-alpha (Canine TNF-alpha Quantikine ELISA Kit), IL-1beta (Canine IL-1 beta DuoSet ELISA), IFN-gamma (Canine IFN-gamma Quantikine ELISA Kit)를 제조사의 프로토콜에 따라 각각 측정하였다. 각 사이토카인의 분비 시점을 고려하여, TNF-alpha와 IL-1beta는 mitogen 자극 후 24시간 후 세포 상층액을 수집하고, IFN-gamma의 경우 자극 후 48시간 후에 세포 상층액을 수집하였다(O'Carroll 등, 2015; Nawaz 등 2017). 수집된 상층액은 1.5 mL 튜브에 옮겨 담아 세포 찌꺼기나 부유물질을 제거하기 위해 1800 rpm (360 g)에서 10분간 원심분리한 다음 사용하였다.

B cell과 T cell의 분포평가

프로폴리스 투여 전과 투여 4주 후 및 8주 후에 채취한 비글견의 혈액에서 1×10^6 cell/mL 이상으로 분리된 PBMC를 Media (RPMI-1640, 10% FBS, 1% P/S)와 혼합하여 2 mL씩 준비하였다. PBS와 원심분리(1200 rpm, 5분)를 이용해 2번의 세척 과정을 거친 다음, 새로운 PBS로 희석하여 1×10^5 cell/mL의 농도로 맞추었고, Fc receptor 차단용 항체(CD16/CD32) 처리 후(4°C, 10분), PBS로 세척 과정을 거쳤다. 준비한 항체(B cell marker-CD21antibody/Tcell marker-CD3 antibody)를 넣고 얼음 위에서 30분간 반응시킨 뒤, PBS로 세척하여 염

색되지 않은 항체를 제거하였다. 최종적으로 FACS Buffer (enzymomics, Daejeon, Korea)로 현탁한 염색 세포는 FACS Calibur (BD Biosciences, California, USA)를 사용하여 분석하였다.

전해질 검사

채혈한 3 mL의 혈액 중 PBMC 분리 후 남은 혈액은 30분 이상 실온에 방치해 두었다가 원심분리기(Centrifuge 5427R, Eppendorf, Germany)로 3000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 분리된 혈청은 전해질 분석기(EasyLyte PLUS REF2121 NA/K/Cl ANALYZER; Medica, USA)를 이용해 혈중 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 농도를 측정하는데 사용되었다.

통계분석

통계결과분석은 SPSS version 25 (SPSS Statistics, IBM, USA, 2009)를 사용하여 수행하였으며, 본 실험에서 얻은 모든 데이터는 평균±표준편차로 표기되었다. 그룹 간의 차이는 Student's t-test로 분석하였고 그룹 사이에서 유의수준($P < 0.05$)에서 유효성을 확인하였다.

결 과

림프구 증식능 측정 결과

대조군과 프로폴리스 단독 투여군 및 프로폴리스/사료 혼합 투여군의 각 비글견의 혈액에서 분리한 PBMC를 Mitogen (IL-2, LPS)로 자극하여 배양한 다음 측정된 림프구 증식능의 결과는, 투여를 시작하기 전에는 대조군에서 1.05 ± 0.71 , 프로폴리스 단독 투여군이 1.08 ± 0.09 , 프로폴리스/사료 혼합 투여군이 1.14 ± 0.22 로 그룹 사이에 통계학적으로 유의미한 차이가 없었다. 프로폴리스를 투여하기 시작한지 4주차 되었을 때 림프구 증식능은 대조군이 0.91 ± 0.09 였던 반면, 프로폴리스 단독 투여군이 1.42 ± 0.25 고, 프로폴리스/사료 혼합 투여군이 1.44 ± 0.18 로, 두 실험군의 결과를 대조군과 비교했을 때 통계학적으로 유의미하게 증가한 것이 확인되었다. 하지만 프로폴리스 단독 투여군과 프로폴리스/사료 혼합 투여군 사이에 유의미한 차이가 없었다. 프로폴리스와 프로폴리스/사료 혼합물을 투여 시작한지 8주차 되었을 때, 대조군의 림프구 증식능은 0.83 ± 0.21 로 측정된 반면, 프로폴리스 단독 투여군이 1.49 ± 0.16 , 프로폴

리스/사료 혼합 투여군이 1.58 ± 0.14 의 결과를 보였다. 4주차와 동일하게 대조군과 두 실험군 사이에는 통계학적으로 유의미한 차이가 보였지만, 프로폴리스 단독 투여군과 프로폴리스/사료 혼합 투여군 간에 유의미한 차이는 없었다(Table 1).

Cytokine 분비량 측정 결과

대조군과 두 실험군의 혈액에서 분리한 PBMC를 Mitogen (IL-2, LPS)과 함께 배양한 상층액으로 ELISA를 실시하여 TNF-alpha, IL-1beta 및 IFN-gamma 수준을 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 프로폴리스와 프로폴리스/사료 혼합물을 투여하기 이전 대조군의 TNF-alpha 값은 150.67 ± 52.79 였고, 프로폴리스 단독 투여군이 152.62 ± 64.48 , 프로폴리스/사료 혼합물 투여군이 151.22 ± 28.11 로 측정되어 세 그룹 사이의 차이가 통계학적 유의성이 없었다. 프로폴리스와 프로폴리스/사료 혼합물 투여를 시작하고 4주 후의 TNF-alpha 값은 대조군은 166.17 ± 61.09 였고, 프로폴리스 단독 투여군은 258.42 ± 70.31 , 프로폴리스/사료 혼합물 투여군은 264.76 ± 16.05 로 측정되었는데, 대조군에 비해 두 실험군의 차이는 통계학적으로 유의성이 있었다. 투여 8주 후, 대조군의 TNF-alpha 분비량은 179.84 ± 63.41 로 투여 전이나 투여 4주 후에 비해 유의성 없는 차이를 유지한 반면, 프로폴리스 단독 투여군은 261.67 ± 34.06 , 프로폴리스/사료 혼합물 투여군은 288.21 ± 26.65 로 대조군에 비해 유의성 있게 상승한 결과를 보여주었다. IL-1beta 역시 프로폴리스와 프로폴리스/사료 혼합물을 투여하기 전과 투여 4주 후, 8주 후 모두 대조군에서 379.45 ± 84.21 , 394.14 ± 78.16 , 391.43 ± 85.61 로 차이가 유의성 없이 유지되었다. 그에 반해 프로폴리스 단독 투여군도 투여 전에는 341.65 ± 25.95 로 대조군과 비슷한 분비량이었다가, 투여를 시작하고 4주 후에는 498.23 ± 56.10 , 프로폴리스/사료 혼합물을 투여하고 4주 후에는 523.10 ± 29.02 로 유의성 있게 분비량이 상승하였다. 투여 8주 후에도 IL-1beta 분비량은 대조군(391.43 ± 85.61)과 비교했을 때, 프로폴리스 단독 투여군(484.74 ± 61.55) 및 프로폴리스/사

료 혼합 투여군(516.87 ± 24.88)에서 공히 유의성 있게 분비량이 증가하였다. 비글견의 혈액에서 분리된 PBMC를 Mitogen (IL-2, LPS)로 자극한 뒤 측정된 IFN-gamma는 대조군이 프로폴리스와 프로폴리스 혼합물 투여전과 투여 4주 후, 8주 후에 170.30 ± 60.89 , 174.11 ± 47.29 , 198.25 ± 61.38 로 유의미한 차이 없이 유지되었다. 실험군인 프로폴리스 단독 투여군은

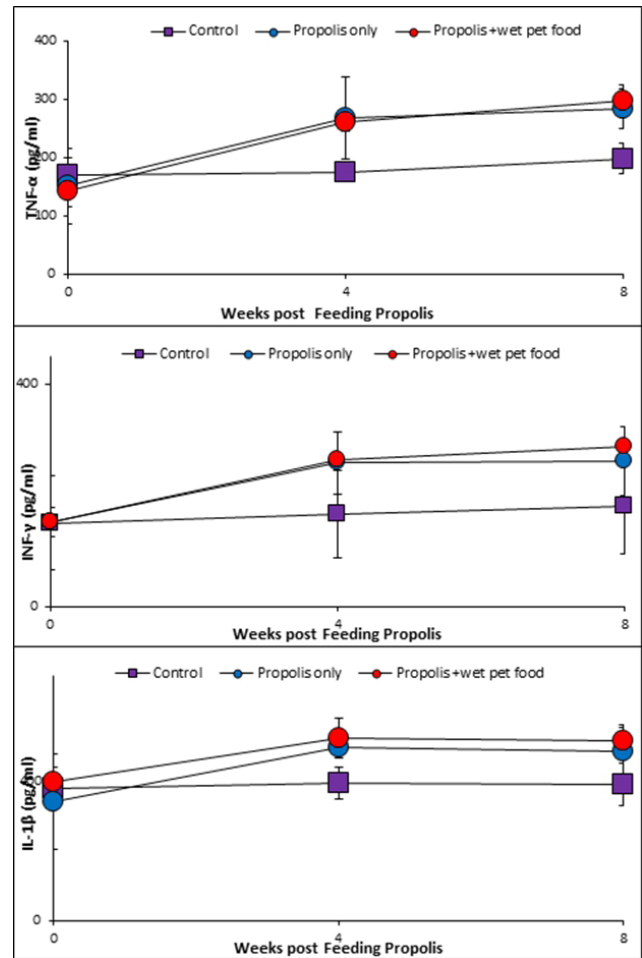


Fig. 1. Evaluation of cytokine levels in beagle dogs after administration of propolis concentrate using ELISA kits.

Table 1. Assessment of lymphocyte proliferation in peripheral blood mononuclear cells of beagle dogs following administration of propolis concentrate, using a cell counting viability assay

Item	Group/week								
	Control			Propolis only			Propolis+wet pet food		
	0	4	8	0	4	8	0	4	8
CCK	1.05±0.71	0.91±0.09	0.83±0.21	1.08±0.09	1.42±0.25	1.49±0.16	1.14±0.22	1.44±0.18	1.58±0.14

CCK, Cell counting kit.

투여 전에 150.77 ± 10.50 이었고, 투여 4주 후 268.31 ± 56.03 , 투여 8주 후에 283.67 ± 42.99 로 유의성 있게 분비량이 증가한 걸 확인할 수 있었다. 또 다른 실험군인 프로폴리스/사료 혼합물 투여군은 투여 시작 전에 142.42 ± 64.13 으로 대조군과 비슷했으나, 투여를 시작하고 4주를 경과하자 261.08 ± 49.76 으로 증가하였고, 8주 경과 후에는 297.54 ± 27.58 로 증가하여 유의성 있는 분비량의 차이를 보여주었다(Fig. 1).

B cell과 T cell의 분포 평가 결과

프로폴리스와 프로폴리스/사료 혼합물을 투여한 비글견의 혈액에서 분리한 PBMC의 B cell과 T cell의 분포 정도를 Flow cytometry 방법을 통하여 평가한 결과, 대조군과 두 가지의 실험군, 투여 시점 모두 B cell과 T cell의 비율이 통계학적인 유의성 없이 비슷한 경향성을 가지고 유지되고 있는 것으로 보아, 정상 면역 범위로 판단되었다(Fig. 2).

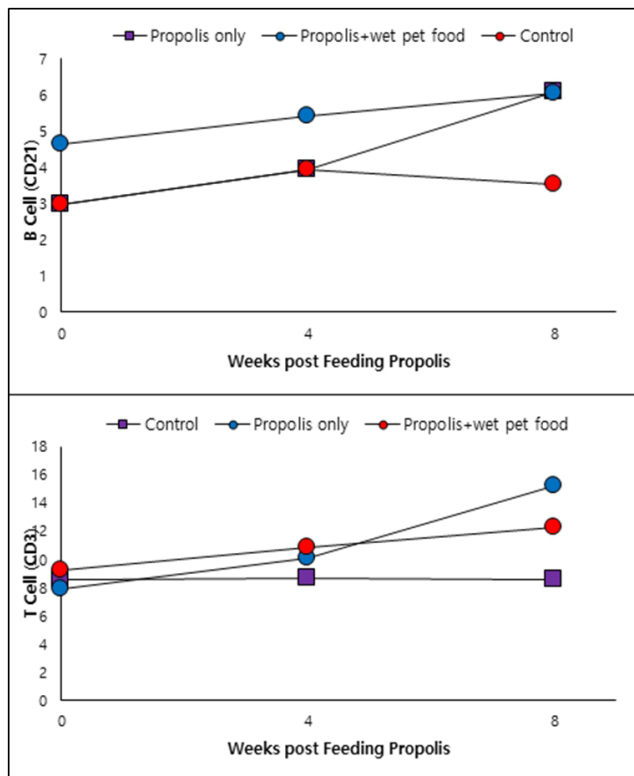


Fig. 2. Analysis of B Cell and T Cell populations in beagle dogs after propolis concentrate administration using flow cytometry and cell sorting ratios.

전해질 검사 결과

프로폴리스 투여 전, 투여 4주 후 및 투여 8주 후에 동일하게 채혈된 혈액 샘플로 진행된 전해질 검사(Na^+ , K^+ , Cl^-)는 실험 비글견의 프로폴리스 혹은 프로폴리스/사료 혼합물 투여로 인해 구토, 설사, 등 이상 증상의 여부를 확인하고 근육 및 신경 기능을 평가하기 위해 실시되었다. 전해질 검사에서 투여 전 대조군의 Na^+ 평균 수치는 144.51 ± 3.55 , 프로폴리스 단독 투여군이 144.54 ± 2.05 , 프로폴리스/사료 혼합 투여군은 140.41 ± 1.45 로 측정되어 유의미한 차이가 없다. 투여 4주 후, 대조군은 146.86 ± 2.20 , 프로폴리스 단독 투여군이 147.65 ± 1.63 , 프로폴리스/사료 혼합 투여군은 142.09 ± 1.02 로 측정되어 통계학적 유의미한 차이가 없었다. 투여 8주 후에도 대조군은 146.67 ± 0.54 , 프로폴리스 단독 투여군은 144.09 ± 0.74 , 프로폴리스/사료 혼합 투여군이 145.61 ± 0.90 으로 통계결과 유의기준($P < 0.05$)을 초과하는 결과를 보였다. 실험군의 혈중 K^+ 평균 수치는 대조군이 투여 0주차에 4.28 ± 0.14 , 프로폴리스 단독 투여군이 4.45 ± 0.14 , 프로폴리스/사료 혼합 투여군은 4.34 ± 0.39 였다. 투여를 시작하고 4주차에 측정된 혈중 K^+ 평균 수치는 대조군이 4.51 ± 0.27 , 프로폴리스 단독 투여군이 44.93 ± 0.17 , 프로폴리스/사료 혼합 투여군이 4.13 ± 0.22 로 통계학적으로 유의미한 차이는 보이지 않았다. 투여 8주차에 측정된 혈중 K^+ 평균 수치도 대조군은 3.88 ± 0.34 였고, 프로폴리스 단독 투여군은 4.32 ± 0.29 , 프로폴리스/사료 혼합 투여군은 4.36 ± 0.13 으로 그룹 사이에 유의미한 차이는 발견되지 않았다. 전해질 균형을 보기 위해 측정된 혈중 Cl^- 의 평균수치는 투여 0주차에 대조군, 프로폴리스 단독 투여군, 프로폴리스/사료 혼합 투여군의 순서로 115.71 ± 1.09 , 115.16 ± 1.44 , 117.46 ± 0.36 으로 비슷한 양상이었고, 투여 4주차에는 동일한 순서대로 118.79 ± 1.12 , 117.68 ± 1.04 , 114.32 ± 1.26 의 값을 보이며 통계학적으로 유의미한 차이가 없음을 보여주었다. 투여 시작 8주 후 마지막 측정에서는 대조군이 115.61 ± 1.28 , 프로폴리스 단독 투여군이 116.47 ± 0.98 , 프로폴리스/사료 혼합 투여군이 115.82 ± 2.01 의 값으로 통계 결과 유의기준($P < 0.05$)을 초과하는 차이를 보였다(Table 2).

고 찰

본 연구는 8주간 비글견에게 5% 프로폴리스 농축액과 동일한 농축액에 비글견의 기호성을 높이기 위해 시판 습식사료를 1:1의 비율로 섞은 혼합물을 경구 투여했을 때, 안정성 파악과 동시

Table 2. Comparison of electrolyte levels of beagle dog among the control, propolis concentrate, and propolis/wet feed administrated groups

Item	Group/week								
	Control			Propolis only			Propolis+wet pet food		
	0	4	8	0	4	8	0	4	8
Na	144.51±3.55	146.86±2.20	146.67±0.54	144.54±2.05	147.65±1.63	144.09±0.74	140.41±1.45	142.09±1.02	145.61±0.90
K	4.28±0.14	4.51±0.27	3.88±0.34	4.45±0.14	4.93±0.17	4.32±0.29	4.34±0.39	4.13±0.22	4.36±0.13
Cl	115.71±1.09	118.79±1.12	115.61±1.28	115.16±1.44	117.68±1.04	116.47±0.98	117.46±0.36	114.32±1.26	115.82±2.01

에 유도되는 면역 반응을 파악하고 비교 분석하기 위해 수행되었다. 대조군, 프로폴리스 단독 투여군 및 프로폴리스/사료 혼합 투여군의 비글견의 혈액에서 투여 전, 투여 4주 후 및 8주 후에 분리한 PBMC를 Flow cytometry로 B cell과 T cell의 분포 정도를 비율로 계산하여 일정한 비율로 유지되어 정상 면역 상태라는 것을 파악하였다. 동일한 PBMC를 mitogen (LPS, IL-2)으로 자극하며 배양한 다음 먼저 CCK (Cell Counting Kit) assay를 통해 세포의 대사 활성을 측정하여 대조군에 비해 프로폴리스 단독 투여군과 프로폴리스/사료 혼합 투여군은 투여를 시작하고 4, 8주 후 유의미하게 증식 정도가 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 분리된 PBMC를 mitogen, LPS로 자극할 경우 B세포와 대식세포 같은 선천 면역 세포를 자극해, TNF-alpha, IL-beta와 같은 염증성 사이토카인 분비를 유도하며, IL-2 자극은 T세포 활성화를 촉진해 IFN-gamma와 같은 적응 면역을 유도한다는 기존 연구들을 참고하여 자극한 PBMC에서 세 가지 사이토카인의 분비량을 ELISA로 측정하였다(Jin 등, 2006; Wu 등, 2016; Portmann, 2024). 그 결과, 염증반응을 조절하며 주로 대식세포와 T세포에서 분비되는 TNF- alpha가 프로폴리스 투여 후 유의미하게 분비량이 증가하는 것을 확인하였고, 이는 염증 반응이 유도되었음을 의미한다(Leal 등, 2013; O'Carroll 등, 2015). 그리고 세포성 면역을 강화하는 역할로 T세포와 대식세포의 활성화를 촉진해서 바이러스 감염 및 종양세포 제거의 주요 역할인 IFN-gamma도 프로폴리스 단독군 및 프로폴리스/사료 혼합 투여군 모두 투여를 시작한 이후 분비량이 유의미하게 증가하여, T세포와 NK세포의 활성화로 인해 바이러스 감염이나 종양에 대한 방어가 강화되었음을 의미한다(Reichler 등, 2020). 더불어, 대식 세포에서 분비되며 염증이 있을 때 세포 사멸과 염증성 반응을 촉진하는 IL-1beta 역시 프로폴리스와 프로폴리스 혼합물 투여 시작 후 분비량이 유의미하게 증가한 것을 확인하였고, 이는 감염이나 외부 자극에 대한 면역세포의 대응이 활발히 이루어지고 있음을 의미한다(López-García and Castro-Manreza, 2021). 본 실험에서 한 가지 더 확인하

고자 했던 기존 시판 사료와 프로폴리스 농축액을 혼합하여 비글견의 기호성은 높이는 방법 역시 농축액만 투여했을 때와 매우 유사한 면역 반응 유지를 보였는데, 진행된 CCK, Flow cytometry, ELISA 모든 실험 결과에서 유의성 있는 면역 증강 경향을 보였다. 추가로 진행된 혈액 내 산과 염기, 수분의 균형을 확인하는 전해질 검사에서도 구토, 설사 등 프로폴리스나 프로폴리스/사료 혼합물 투여로 인한 이상행동이 없음을 확인하였다. 프로폴리스가 가지고 있는 항염증, 항산화, 항균, 면역조절 기능은 면역 반응을 증진시키고 염증성 질환을 완화하는데 도움을 줄 뿐만 아니라 프로폴리스가 대식세포와 림프구를 자극하여 면역시스템의 다양한 측면을 활성화시켜 감염과 질병을 예방하는 효과가 있다고 보고되었다(Sforcin과 Biagi, 2022; Zamarrenho 등, 2023). 또한, 다양한 프로폴리스의 제형 개발로 영양 보충제, 약물 개발에 활용되고 있으며, 이를 통해 면역력 향상과 항바이러스 효과도 연구 중에 있다(Yosri 등, 2021). 이처럼 활용범위가 다양한 프로폴리스를 수의학분야에서도 건강 보조 식품이나 항염증 치료제 등으로 활용범위를 확대할 수 있는 다양한 추가 연구가 필요하다. 본 연구에서 확보된 프로폴리스의 제형별 투여효과 및 안전성에 대한 평가결과는 반려견에 대한 프로폴리스 사용의 유용성을 확인하는 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

결론

본 연구에서 2개 프로폴리스 제형, 즉, 5% 프로폴리스 농축액과 프로폴리스/사료 혼합물(프로폴리스 농축액과 시판 애견 습식사료의 1:1 비율 혼합물)을 비글견에 각각 투여하여 비교 분석한 결과, 체내 수분 균형 조절 및 혈압 유지, 실험대상의 구토, 설사, 탈수 여부나 신경과 근육 기능, 신장 기능, 전해질 불균형 여부를 확인하기 위한 혈중 전해질 검사에서 모두 유의미한 차이가 없이 정상적인 평균 수치로 유지되어 비글견에서의 안전성이 증명되었다. 비글견의 혈액에서 분리한 PBMC에서 TNF-

alpha, IFN-gamma, IL-1beta 등 면역력 증강과 밀접한 연관이 있는 사이토카인들이 유의미하게 유도 분비되는 것이 확인되어 5%의 프로폴리스 농축액 단독 투여 또는 해당 농축액과 시판 애견 습식사료의 혼합 투여 시에도 동일하게 안전하며, 면역력이 증강되는 것을 확인하였다. 따라서, 시판 습식사료에 프로폴리스를 혼합 투여함으로써 기호성을 높이는 것이 향후 프로폴리스와 연관된 건강 보조 식품 제조에 한가지 대안이 될 수 있을 것이다.

CONFLICT OF INTEREST

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

ORCID

Hyejean Cho, <https://orcid.org/0009-0000-9461-2013>

REFERENCES

- Bhatti N, Hajam YA, Mushtaq S, Kaur L, Kumar R, Rai S. 2024. A review on dynamic pharmacological potency and multifaceted biological activities of propolis. *Discover Sustainability* 5: 185.
- da Rosa C, Bueno IL, Quaresma ACM, Longato GB. 2022. Healing potential of propolis in skin wounds evidenced by clinical studies. *Pharmaceuticals* 15(9): 1143.
- Glausiusz J. 2021. How dogs became humans' best friends: from Neanderthals to now. *Nature* 599(7886): 553-554.
- Jin P, Wang E, Provenzano M, Deola S, Selleri S, Ren J, Voiculescu S, Stroncek D, Panelli MC, Marincola FM. 2006. Molecular signatures induced by interleukin-2 on peripheral blood mononuclear cells and T cell subsets. *J Transl Med* 4: 26.
- Kubiliene L, Laugaliene V, Pavilonis A, Maruska A, Majiene D, Barcauskaite K, Kubilius R, Kasparaviciene G, Savickas A. 2015. Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC Complement Altern Med* 15: 156.
- Leal MC, Casabona JC, Puntel M, Pitossi FJ. 2013. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : reliable targets for protective therapies in Parkinson's disease? *Front Cell Neurosci* 7: 53.
- López-García L, Castro-Manrreza ME. 2021. TNF- α and IFN- γ participate in improving the immunoregulatory capacity of mesenchymal stem/stromal cells: importance of cell-cell contact and extracellular vesicles. *Int J of Mol Sci* 22(17): 9531.
- Nawaz R, Zahid S, Idrees M, Rafique S, Shahid M, Ahad A, Amin I, Almas I, Afzal S. 2017. HCV-induced regulatory alterations of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ operative, leading liver en-route to non-alcoholic steatohepatitis. *Inflamm Res* 66(6): 477-486.
- O'Carroll SJ, Kho DT, Wiltshire R, Nelson V, Rotimi O, Johnson R, Angel CE, Graham ES. 2015. Pro-inflammatory TNF α and IL-1 β differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells. *J Neuroinflammation* 12: 131.
- Portmann K, Linder A, Eyer K. 2024. Stimulation-induced cytokine polyfunctionality as a dynamic concept. *eLife* 12:RP89781.
- Reichler MR, Hirsch C, Yuan Y, Khan A, Dorman SE, Schluger N, Sterling TR, Tuberculosis Epidemiologic Studies Consortium Task Order 2 Team. 2020. Predictive value of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 for tuberculosis among recently exposed contacts in the United States and Canada. *BMC Infect Dis* 20: 553.
- Sforzin JM, Biagi M. 2022. Effects of the green propolis on the immune response. In: Baccharis (Ed.), *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. (pp. 535-546). Springer, Cham.
- Svetikiene D, Zamokas G, Jokubaite M, Marksa M, Ivanauskas L, Babickaite L, Ramanauskiene K. 2024. The comparative study of the antioxidant and antibacterial effects of propolis extracts in veterinary medicine. *Vet Sci* 11(8): 375.
- Wu Y, Yue B, Liu J. 2016. Lipopolysaccharide-induced cytokine expression pattern in peripheral blood mononuclear cells in childhood obesity. *Mol Med*

Rep 14(6): 5281-5287.

Yosri N, Abd El-Wahed AA, Ghonaim R, Khattab OM, Sabry A, Ibrahim MAA, Moustafa MF, Guo Z, Zou X, Algethami AFM, Masry SHD, AlAjmi MF, Afifi HS, Khalifa SAM, El-Seedi HR. 2021. Anti-viral and immunomodulatory properties of propolis: chemical diversity, pharmacological properties, preclinical and clinical applications, and in silico potential

against SARS-CoV-2. Foods 10(8): 1776.

Zamarrenho LG, de Lima MHF, Hori JI, Lima JA, Ambrósio SR, Bastos JK, De Jong D, Berretta AA. 2023. Effects of three different Brazilian green propolis extract formulations on pro- and anti-inflammatory cytokine secretion by macrophages. Applied Sciences 13(10): 6247.