J Korean Soc Food Sci Nutr
44(2), 182~190(2015)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.2.182

마우스세포를 이용한 홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리에 따른 면역활성 효과

변명우[1] · 변의홍[2]

[1]우송대학교 외식조리영양학부
[2]공주대학교 식품공학과

Immunological Synergistic Effects of Combined Treatment with Herbal Preparation (HemoHIM) and Red Ginseng Extracts

Myung-Woo Byun[1] and Eui-Hong Byun[2]

[1]*Department of Culinary Nutrition, Woosong University*
[2]*Department of Food Science and Technology, Kongju National University*

ABSTRACT This present study demonstrates the immunological synergistic effects of herbal preparation (HemoHIM) and red ginseng powder granule in various immune cell models (bone marrow-derived macrophages, dendritic cells, and mouse splenocytes) from mice. Both herbal preparation and red ginseng extracts were treated to bone-marrow derived macrophages, dendritic cells, and mouse splenocytes, and there was no cytotoxicity at a dose below 200 μg/mL. Cell proliferation and cytokine [tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-6, and IL-12] production tested in bone marrow-derived macrophages and dendritic cells significantly increased upon combined treatment. Cell surface marker (CD 80/86, MHC class Ⅰ/Ⅱ)-mediated immune cell activation was highly elevated by combined treatment. For cytokine production in splenocytes, combined treatment significantly increased production of Th 1 type cytokines [IL-2 and interferon (IFN)-γ] but not Th 2 type cytokines (IL-4 and IL-10). Therefore, combined treatment with HemoHIM and red ginseng extracts is an effective method to establish powerful immunological synergy in immune cells.

Key words: HemoHIM, red ginseng extracts, macrophage, dendritic cell, splenocyte

서 론

면역기능은 외부의 병원성 인자들로부터 자기를 보호하기 위한 일종의 자기방어 시스템으로 이러한 면역기능이 떨어질 경우 인체는 다양한 질병에 노출될 수 있다. 면역반응은 항원에 대한 특이성에 따라 선천성 면역반응과 후천성 면역반응으로 구분되는데, 선천성 면역반응은 주로 탐식세포들(대식세포 및 수지상세포)에 의해서 이루어지고 항원 특이적인 반응을 수반하지 않는다. 후천성 면역반응은 주로 T 세포 및 B 세포에 의하여 이루어지고 선천성 면역반응 후에 식세포에 의하여 제시되는 특이 항원을 인식하면서 면역반응이 개시되며, 면역반응의 강도가 선천면역에 비하여 매우 큰 특징을 가지고 있다(1,2).

최근 급속한 경제성장과 의학기술의 발달로 인해 인간의 수명이 연장되고, 특히 식생활의 서구화로 인한 즉석 편의식품 섭취의 증가로 인하여 성인병 및 면역관련 질환에 노출되는 빈도가 계속해서 증가되고 있는 추세이다(3). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근 천연물로부터 면역활성 물질들을 분리하는 연구가 선진국을 중심으로 세계 각국에서 활발하게 이루어지고 있는 추세이며, 국내에서도 자생식물로부터 생리활성물질을 추출하여 추출물이 가지는 다양한 면역활성에 관하여 살펴보는 연구가 다양하게 진행되고 있다(4,5).

본 실험에 사용된 생약복합추출물(제품명: 헤모힘, HemoHIM)은 건강기능성 식품으로 면역기능개선 효능 부분에서 식품의약품안전처로부터 개별인증을 받은 제품이며, 당귀, 천궁, 작약 등의 천연물을 이용하여 제조한 생약복합제제로써 면역세포 활성화 효과, 면역조혈계 회복촉진 효과, 조직재생 및 면역조혈계의 방호 효과, 항산화 효과 등의 다양한 면역증강 효과가 보고되고 있다(6-8). 특히 HemoHIM은 선천면역계에서 중요한 역할을 수행하는 수지상세포의 분화와 관련되는 세포 표면 활성 인자인 CD 86, 40의 발현을 증가시켜 수지상세포의 분화 유도를 촉진시키고 항원제시 능력을 증가시키는 것으로 보고되며, 적응면역계에서는 수지상세포의 분화촉진에 의한 면역 T 세포의 세포 증식을 증가시

Received 2 October 2014; Accepted 24 November 2014
Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan, Chungnam 340-800, Korea
E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr, Phone: +82-41-330-1481

키고 Th 1 type의 사이토카인인 interleukin(IL)-2와 interferon(IFN)-γ의 분비를 유의적으로 증가시키는 것으로 보고된다(9).

또한 홍삼은 우리나라를 대표하는 약용작물인 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 뿌리를 세척한 후 증숙과 건조의 가공과정을 거쳐 제조하며, 가공과정에 의해 담황색 또는 담적갈색의 색상을 나타낸다. 홍삼은 사포닌(ginsenoside)과 다당체(polysaccharide) 등의 다양한 약리학적인 유효성분을 다량 함유하고 있으며, 이러한 사포닌과 다당체들은 면역력 증강에 매우 효과적인 것으로 보고된다(10). 또한 이러한 홍삼 유래의 유효 성분들은 인삼에도 일정량으로 함유되어 있으나 홍삼의 제조 및 가공(증숙 및 건조) 과정에서 다량으로 증가한다고 보고된다(11). 인삼의 사포닌(ginsenoside) 성분은 증숙이나 건조 과정을 거치면서 ginsenoside의 20번 탄소 위치의 glycosyl 잔기가 이탈하거나 수산기가 치환되어 ginsenoside Rg_3, 20(R)-ginsenoside Rg_2, 20(S)-ginsenoside Rh_1 등의 미량 사포닌 성분들이 증가하여 인삼보다 높은 생리활성을 나타낸다고 보고되며(12), 인삼의 다당체 성분은 증숙 및 건조 과정을 거치면서 산성다당체의 함량이 크게 증가되고 중성당의 조성이 바뀌면서 생리활성이 크게 증가되는 것으로 보고된다(13).

따라서 본 연구에서는 홍삼추출물과 생약복합추출물이 주요 기능성분은 다르지만 면역활성이라는 생리활성 측면에서 동일한 효과를 인정하고 있어서 수지상세포, 대식세포 및 비장세포 등의 다양한 면역세포를 마우스를 통하여 직접 분리하여 두 물질을 병용 처리하였을 때 나타나는 면역활성의 작용에 관하여 평가해 보았다.

재료 및 방법

실험재료 및 실험동물

본 실험에서 사용한 생약복합추출물(제품명: 헤모힘, HemoHIM)은 ㈜에터미(Gongju, Korea)에서 구입하였고, 홍삼추출물(제품명: 홍삼단)은 우송대학교 벤처기업인 ㈜홍삼단(Daejeon, Korea)에서 각각 구입하여 사용하였다. 실험동물은 6주령(18~20 g)의 C57BL/6 웅성 마우스를 Orient사(Seongnam, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 분양받은 마우스는 동물사육실 내부 환경에 1주간 순화시킨 후 미분화 골수세포 및 비장세포를 채취하기 위하여 사용하였다.

골수세포로부터 대식세포 및 수지상세포로의 분화 유도

본 연구에 사용된 실험동물은 한국원자력연구원 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(KAERI-IACUC-2013-001). C57BL/6 마우스로부터 골수 채취용 주사기(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용해 대퇴부 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 차가운 phosphate buffered saline(PBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)으로 3회 세척한 후 적혈구를 제거하기 위하여 red blood cell(RBC) lysis buffer(Invitrogen Co.)를 5 mL 처리하여 10분간 방치하였다. PBS로 3번 세척하여 적혈구 찌꺼기를 완전히 제거하였다. 분리한 미분화 골수세포를 수지상세포로 분화시키기 위하여 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함되어 있는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지(Invitrogen Co.)에 2 mM L-glutamin, 100 unit/mL penicillin/streptomycin, 50 μM mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid, 1 mM sodium pyruvate, 20 ng/mL granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF, R&D System, Minneapolis, MN, USA), 20 ng/mL IL-4(R&D System)를 첨가하여 8일 동안 배양하였다. 또한 대식세포로의 분화를 유도하기 위해 10% FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 2 mM L-glutamin, 100 unit/mL penicillin/streptomycin, 50 μM mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid, 1 mM sodium pyruvate, 25 ng/mL macrophage colony stimulating factor(MC-SF, R&D System)를 첨가하여 4일 동안 배양하였다.

대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능 평가

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포에 대한 세포 증식능(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 대식세포 및 수지상세포를 각각 96 well plate(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 well당 3×10^5개로 분주한 후, 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 100 μg/mL 및 200 μg/mL의 농도 또는 홍삼추출물 100 μg/mL와 생약복합추출물 100 μg/mL를 동시에 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO_2 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능을 MTT 방법에 의하여 측정하였다. MTT 방법은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 phosphate buffered saline(PBS, Invitrogen Co.)에 5 mg/mL의 농도로 용해하여 well당 30 μL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후, 배양상등액를 제거하고 세포 내 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 홍삼추출물과 생약복합추출물 각각의 대식세포 및 수지상세포에 대한 세포 증식능은 다음식에 의하여 계산되었다.

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

대식세포 및 수지상세포에 대한 사이토카인 분비능

홍삼추출물의 처리가 대식세포 및 수지상세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 대식세포 및 수지상세포를 각각 48 well plate에 well당 7×10^5개로 분주한 후, 홍삼추출물과 생약복

합추출물을 각각 100 μg/mL 및 200 μg/mL의 농도 또는 홍삼추출물 100 μg/mL와 생약복합추출물 100 μg/mL를 동시에 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO_2 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양 상등액에 포함되어 있는 IL-6 및 tumor necrosis factor(TNF)-α의 함량을 측정하였다. 사이토카인의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(BD Biosciences)를 사용하여 측정하였다.

대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자(cell surface marker)에 미치는 영향

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 대식세포 및 수지상세포를 각각 6 well plate에 well당 1×10^6개로 분주한 후, 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 200 μg/mL의 농도 또는 홍삼추출물 100 ng/mL와 생약복합추출물 100 ng/mL를 병용하여 처리한 후 24시간 동안 반응시키고 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, 대식세포와 수지상 세포 표면 활성 인자 분석을 위하여 anti-CD80-PE, anti-CD86-PE, anti-MHC Ⅰ 및 Ⅱ-PE (BD Biosciences)와 같은 세포 표면 항체를 각각 1,000배 희석하여 각각의 세포에 처리하고 30분 동안 반응시키고 유세포 분석기(FACS callibur, BD Biosciences)를 이용하여 홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자의 발현에 미치는 영향에 관하여 분석하였다.

마우스로부터 비장세포 분리

1주간의 순화를 마친 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 비장을 무균적으로 적출하여 10%의 FBS와 항생제 penicillin과 streptomycin(100 unit/mL, 100 μg/mL)을 함유한 RPMI-1640 배지로 세척한 후 tissue grinder(Corning Costar, Corning, NY, USA)로 균질화하여 비장세포를 유리시켰다. 세포현탁액에 적혈구를 제거하기 위하여 RBC lysis buffer(BD Biosciences)를 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 혈구계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다.

비장세포의 세포 증식능 평가

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 비장세포의 증식능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 96 well plate에 well당 1×10^6개의 비장세포를 분주한 후, 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 100 μg/mL 및 200 μg/mL의 농도 또는 홍삼추출물 100 μg/mL와 생약복합추출물 100 μg/mL를 병용 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO_2 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, WST-1®(Daeil Lap Science, Seoul, Korea) 용액을 각각의 well에 10 μL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 증식능을 평가하였다. 비장세포의 증식능은 다음 식에 의하여 계산되었다.

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

비장세포의 대한 사이토카인 분비능 평가

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 비장세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 비장 조직으로부터 분리된 비장세포를 48 well plate에 well당 2×10^6개씩 분주한 후 200 μg/mL 농도의 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 처리하고, 또는 100 ng/mL 농도의 홍삼추출물과 100 ng/mL 농도의 생약복합추출물을 병용 처리한 후 각각 24시간 동안 반응시키고 배양 상등액에 존재하는 사이토카인(IL-2, 4, 10, IFN-γ)의 함량에 관하여 측정하였다. 사이토카인의 측정은 ELISA kit(eBioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, 21, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Student's two tailed *t*-test로 $P<0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능에 미치는 영향

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 C57BL/6 마우스로부터 미분화 골수 세포를 분리하여 대식세포 및 수지상 세포로 각각 분화시킨 후, 분화된 대식세포 및 수지상 세포에 홍삼추출물을 100 μg/mL와 200 μg/mL로 각각 처리하였을 때의 대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능을 Fig. 1에 나타냈다. 또한 홍삼추출물과 생약복합추출물 처리 농도를 각각 200 μg/mL로 고정하고 병용 처리구에서는 홍삼추출물 100 μg/mL와 생약복합추출물 100 μg/mL 농도로 동시에 처리하였을 때 나타나는 세포 증식능의 변화를 Fig. 2에 나타냈다. 각각의 대식세포 및 수지상세포에서 홍삼추출물과 생약복합추출물의 처리는 농도 의존적으로 세포의 증식능을 증가시키는 것으로 나타났으며, 병용 처리구에서는 각각 단독으로 처리한 처리구에 비하여 유의적으로 높게 세포 증식능이 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 홍삼추출물과 생약복합추출물 처리는 대식세포 및 수지상세포에 대한 세포독성을 일으키지 않는 것으로 판단되며, 홍삼추출물 및 생약복합추출물의 처리는 단독으로 처리하였을 때보다 병용으로 처리

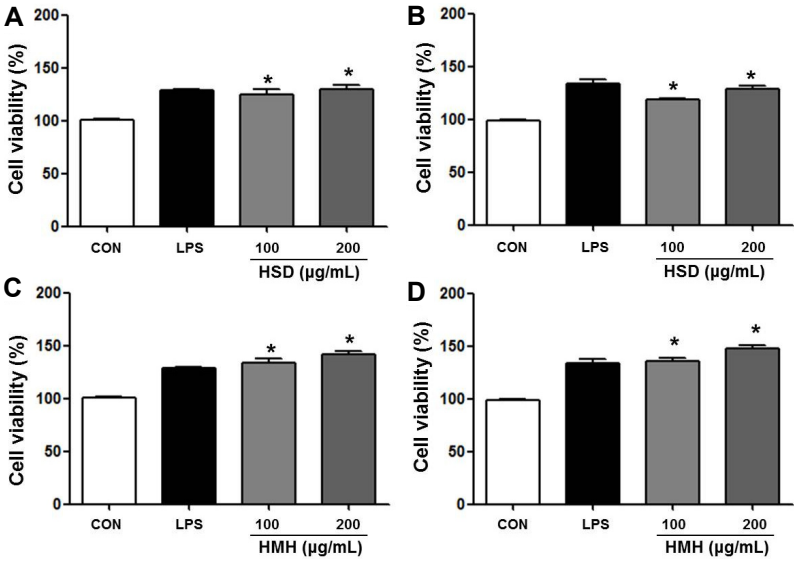

Fig. 1. Cell proliferation activity of red ginseng extract (HSD) and HemoHIM (HMH) in bone-marrow derived macrophage and dendritic cell. Each samples were treated at the concentration of 100 and 200 μg/mL in bone-marrow derived macrophage (A, C) and bone-marrow derived dendritic cell (B, D). Cell proliferation was conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of $^{*}P<0.05$.

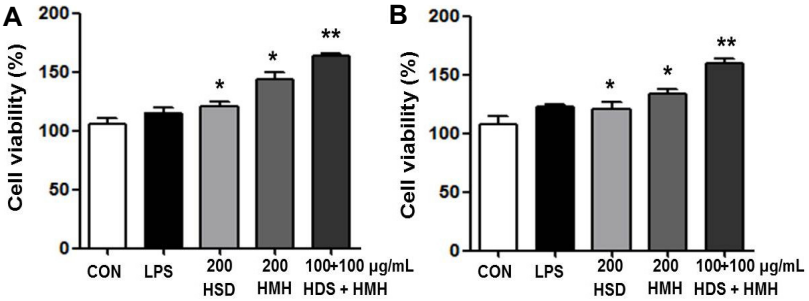

Fig. 2. Cell proliferation activity of combined treatment of red ginseng extract (HSD) and HemoHIM (HMH) in bone-marrow derived macrophage and dendritic cell. Each samples were treated at the concentration of 200 μg/mL or combined treated at the concentration of 100 μg/mL (HSD and HMH) in bone-marrow derived macrophage (A) and bone-marrow derived dendritic cell (B). Cell proliferation was conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$.

하였을 때 세포 증식능의 증가에 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

인체(숙주)의 생체방어(면역) 기작은 매우 복잡하고 각각 다양한 세포들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 생체방어 기작 중 병원체가 생체 내로 침입하였을 때 가장 먼저 반응하는 세포들은 단핵구(monocyte), 호중구(neutrophile) 및 탐식세포(phagocyte) 등이 있고, 이들은 선천면역체계의 중추적인 역할을 담당한다(14). 이 중 탐식세포인 대식세포(macrophage) 및 수지상세포(dendritic cell)는 점막을 가지고 있는 상피세포 장벽 이후 생체방어 시스템에 있어 최초로 병원체에 대응하는 면역세포로써 항원의 감시 및 이동, 항원의 탐식 및 제거에 매우 중요한 역할을 담당한다(15). 탐식세포들은 항원제시세포로써 후천면역계를 담당하는 T 세포와 반응하여 T 세포의 활성을 조절하는 역할을 수행하므로 선천면역뿐만 아니라 후천면역계에서도 중요한 역할을 수행한다(15).

따라서 이러한 탐식세포들의 활성을 조절하는 것은 면역 관련 질병들의 예방 및 치료에 관한 무한한 가능성을 제시하며, 본 연구에서도 마우스 골수로부터 분리한 미분화 골수세포를 탐식세포(대식세포 및 수지상세포)로 분화하여 홍삼농축 분말과립을 처리하였을 때 탐식세포들의 세포 증식능이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다.

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포에 대한 사이토카인 분비능에 미치는 영향

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포 등의 탐식세포의 활성에 어떠한 영향을 미치는 알아보기 위하여 활성화된 대식세포 및 수지상세포가 분비하는 사이토카인의 분비능에 관하여 알아보았다. 생체 외부로부터 병원체가 유입되면 면역세포들은 숙주를 방어하기 위하여 활성화된다. 특히 대식세포 및 수지상세포와 같은 탐식세포들이 활성화되면 부착성이 강해지며, 외부 바이러스나 세균에 오염된 세포를 직접적으로 탐식하여 사멸시키거나 간접적으로 면역력을 활성화시키는 사이토카인이라는 물질을 생산한다(16). 사이토카인은 면역세포 간의 상호협력을 중재하는 역할을 수행하며, 기타 외부에서 오는 여러 가지 자극에 대하여 한 개체의 세포와 조직들이 유기적으로 작용하도록 도와줄 뿐만 아니라 조혈작용, 면역반응, 일반적인 염증과정 등을 조절하는 것으로 보고된다(17). 대식세포와 수지상세포가 생산하는 대표적인 사이토카인으로 IL-1β, 6 및 TNF-α 등이 있으며, 이들은 대식세포와 수지상세포의 활성화 지표로 주로 사용된다(17). 본 연구에서도 홍삼추출물과 생약복합추출물을 골수세포로부터 분화시킨 대식세포 및 수지상세포에 각각 200 μg/mL의 농도로 고정하여 처리하고 병용 처리구에서는 홍삼추출물 100 μg/mL와 생

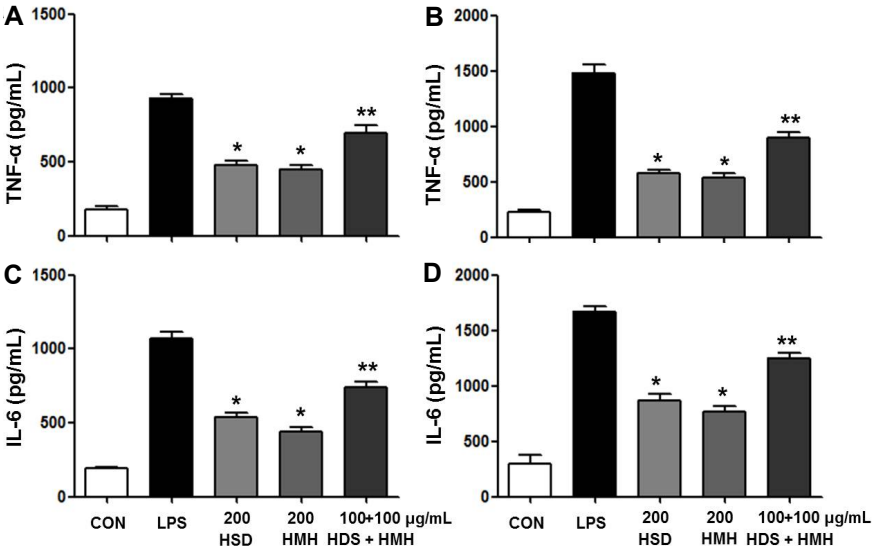

Fig. 3. Cytokine (TNF-α and IL-6) production activity of combined treatment of red ginseng extract (HSD) and HemoHIM (HMH) in bone-marrow derived macrophage and dendritic cell. Each samples were treated at the concentration of 200 μg/mL or combined treated at the concentration of 100 μg/mL (HSD and HMH) in bone-marrow derived macrophage (A, C) and bone-marrow derived dendritic cell (B, D). Cytokine production was conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$.

약복합추출물 100 μg/mL 농도로 동시에 처리하였을 때 나타나는 사이토카인의 분비능의 변화를 Fig. 3에 나타냈다. 실험 결과 홍삼추출물과 생약복합추출물은 각각 처리하였을 때도 사이토카인의 함량을 증가시켰지만 병용으로 처리하였을 때 사이토카인의 분비를 더욱더 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 홍삼추출물과 생약복합추출물은 각각을 독립적으로 처리하는 것보다 두 가지를 병용으로 처리하였을 때 면역학적인 상승효과가 더욱더 증가되는 것으로 사료된다.

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자에 미치는 영향

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 대식세포 및 수지상세포의 활성화에 주는 영향을 직접적으로 평가해 보기 위하여 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면에 부착된 세포 표면 활성 인자(cell surface activation marker)인 cluster of differentiation(CD) molecule의 발현에 관하여 유세포 분석기를 통하여 관찰하였다. 다양한 면역세포구들은 세포 표면에 가지고 있는 표면분자구조에 따라 서로를 구분하며, 이러한 구분은 분화집단(cluster of differentiation, CD)이라는 표현형을 사용한다(18). 이러한 표현형인 CD는 같은 종류의 세포를 분리하거나 분석하는 연구에도 매우 유용하게 사용되며, 또한 세포의 활성화와 관련하여 중요한 지표로 사용되기도 한다(19). 본 연구에서는 대식세포와 수지상세포가 활성화되었을 때 가지는 표현형인 CD80과 CD86의 발현에 관하여 유세포 분석기를 통하여 분석하였다(Fig. 4). 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 200 μg/mL로 고정하여 처리하고 병용 처리구에서는 홍삼추출물 100 μg/mL와 생약복합추출물 100 μg/mL 농도로 동시에 처리하였을 때 각각 독립적으로 처리된 그룹보다 병용으로 처리된 그룹에서 탐식세포의 표면 활성 인자인 CD80과 CD86의 발현이 더욱더 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

또한 선천면역을 담당하는 탐식세포가 병원체를 탐식하게 되면 후천성 면역을 담당하는 T 세포에게 병원체의 항원을 제시하게 되는데, 이때 항원을 제시하는 과정에서 직접적으로 항원을 제시할 수 없고 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex: MHC)라고 하는 대식세포 표면에 발현하는 단백질에 항원을 결합시켜서 전달한다(20). 탐식세포가 내재하고 있는 주조직적합성 복합체는 MHC class Ⅰ과 Ⅱ가 존재하며 이들은 탐식세포가 활성화되지 않았을 때는 세포 표면에 적은 양이 발현되지만 활성화되면 발현되는 양이 현저히 증가하여 T 세포에 많은 양의 항원을 전달할 수 있으며, T 세포를 직접적으로 활성화시켜 후천성 면역반응을 활발히 진행시킨다(21). 따라서 주조직적합성 복합체의 발현 증가는 탐식세포의 활성화에 매우 밀접한 관련이 있으며, 본 연구에서도 홍삼추출물과 생약복합추출물 병용 처리가 탐식세포인 대식세포 및 수지상세포의 활성화에 미치는 영향에 대해 평가하기 위하여 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 200 μg/mL로 고정하여 처리하고 병용 처리구에서는 홍삼추출물 100 μg/mL와 홍삼추출물과 생약복합추출물 100 μg/mL 농도로 동시에 처리하였을 때 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자인 MHC class (Ⅱ)의 발현에 관하여 유세포 분석기를 사용하여 분석해보았다. 홍삼추출물과 생약복합추출물이 독립적으로 처리된 처리구보다 병용으로 처리된 그룹에서 유의적으로 MHC class(Ⅱ)의 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 따라서 이러한 결과로 미루어 보아 홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리는 대식세포 및 수지상세포의 세포 표면 활성 인자들의 발현을 직접적으로 증가시켜 면역세포를 활성화시키는 것으로 사료된다.

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 비장세포의 증식능에 미치는 영향

비장은 혈액에서부터 유래되는 외래항원에 대하여 주된

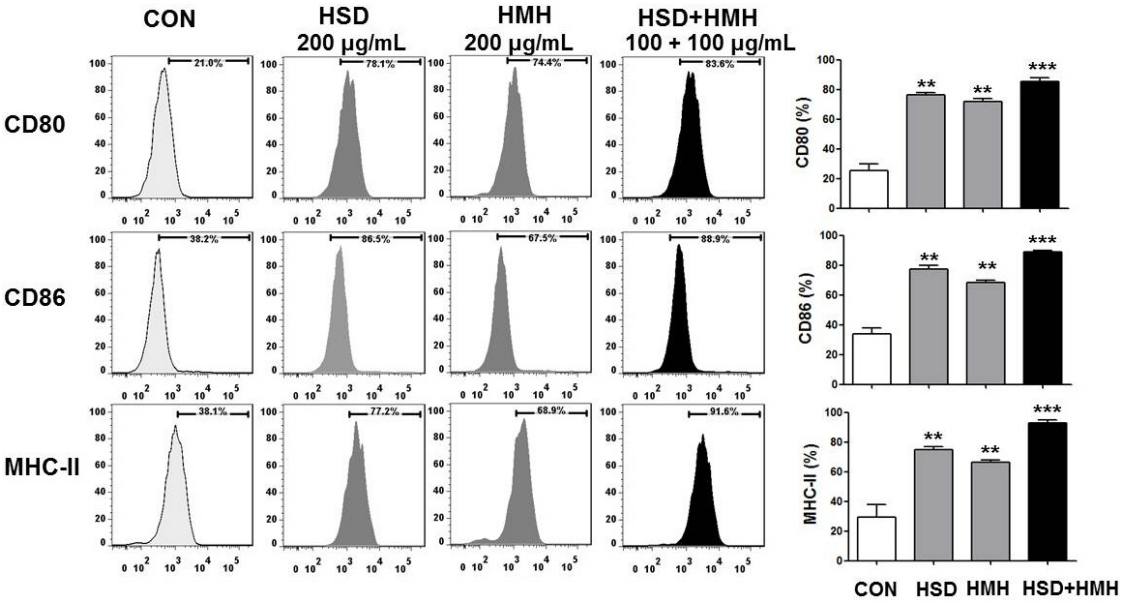

Fig. 4. Expression of costimulatory (CD80, 86) and MHC class (Ⅱ) molecules by combined treatment of red ginseng extract (HSD) and HemoHIM (HMH) in bone-marrow derived macrophage. Each samples were treated at the concentration of 200 μg/mL or combined treated at the concentration of 100 μg/mL (HSD and HMH) in bone-marrow derived macrophage. All experiments were conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$.

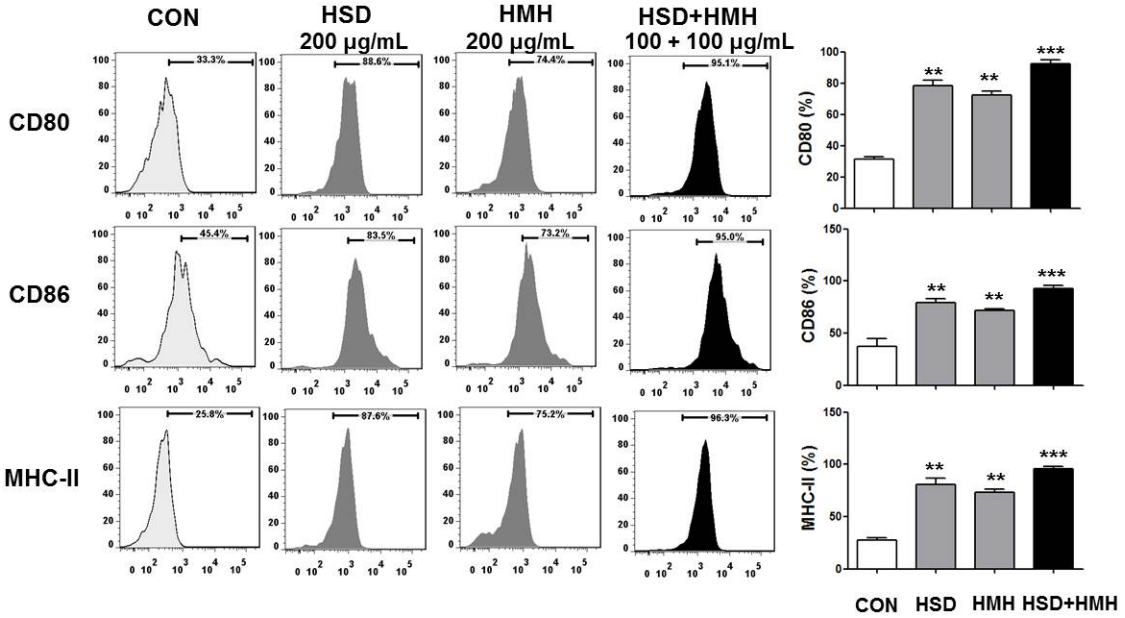

Fig. 5. Expression of costimulatory (CD80, 86) and MHC class (Ⅱ) molecules by combined treatment of red ginseng extract (HSD) and HemoHIM (HMH) in bone-marrow derived dendritic cell. Each samples were treated at the concentration of 200 μg/mL or combined treated at the concentration of 100 μg/mL (HSD and HMH) in bone-marrow derived dendritic cell. All experiments were conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$.

보호 면역을 수행하며, B 및 T 림프구의 성숙과 분화가 이루어지는 림프기관으로 이러한 림프구의 증식은 면역시스템에서 매우 중요한 의미를 갖게 된다(22). 비장에 존재하는 면역세포의 분포를 보면 T 세포가 60% 이상을 차지하며, 나머지는 B 세포 및 대식세포들이 차지한다. 따라서 면역증강물질의 면역활성을 확인하는 데 있어서 면역 T 세포의 활성화를 알아보기 위하여 비장세포를 주로 사용한다(23). 앞선 연구 결과를 통하여 홍삼 농축 분말과립 및 헤모힘의 병용 처리는 선천면역계를 담당하는 탐식세포를 활성시킨다는 결론을 도출할 수 있었고, 후천면역계를 담당하는 T

세포에 대한 면역상승 효과를 알아보기 위하여 비장 조직으로부터 비장세포를 분리하여 홍삼추출물과 생약복합추출물을 병용 처리하여 면역상승 효과에 관하여 알아보았다.

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 마우스로부터 분리한 비장세포의 세포 증식능에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 C57BL/6 마우스로부터 무균적으로 적출된 비장세포에 홍삼추출물을 100 μg/mL와 200 μg/mL로 각각 처리하였고, 또한 병용 처리구에서는 홍삼추출물 100 μg/mL와 생약복합추출물 100 μg/mL 농도로 동시에 처리하여 비장세포의 증식능을 Fig. 6에 나타내었다. 비장세포에 홍삼추출물과 생약복합추출물 각각의 처리는 농도 의존적으로 비장세포의 증식능을 증가시키는 것으로 나타났으며, 병용 처리구에서는 각각 단독으로 처리한 처리구에 비하여 유의적으로 높게 세포 증식능이 증가되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 보아 홍삼추출물과 생약복합추출물의 처리는 대식세포 및 수지상세포와 같은 선천면역계를 담당하는 탐식세포뿐만 아니라 후천면역을 담당하는 T 세포가 밀집하여 있는 비장으로부터 분리한 비장세포에서도 세포독성을 일으키지 않고 세포 증식능을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으며, 홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리는 비장세포의 증식능에 대해서도 탐식세포의 결과와 유사하게 면역상승 효과를 보이는 것으로 관찰되었다.

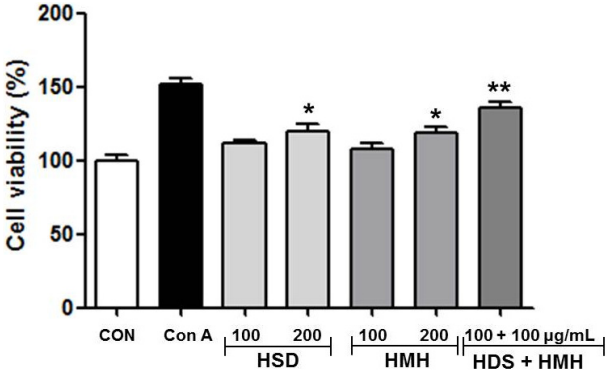

Fig. 6. Cell proliferation activity of combined treatment of red ginseng extract (HSD) and HemoHIM (HMH) in splenocyte separated from mice. Each samples were treated at the concentration of 100 and 200 μg/mL or combined treated at the concentration of 100 μg/mL (HSD and HMH) in splenocyte. Cell proliferation was conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$.

홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 비장세포에 대한 사이토카인 분비능에 미치는 영향

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(24). Th1 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로는

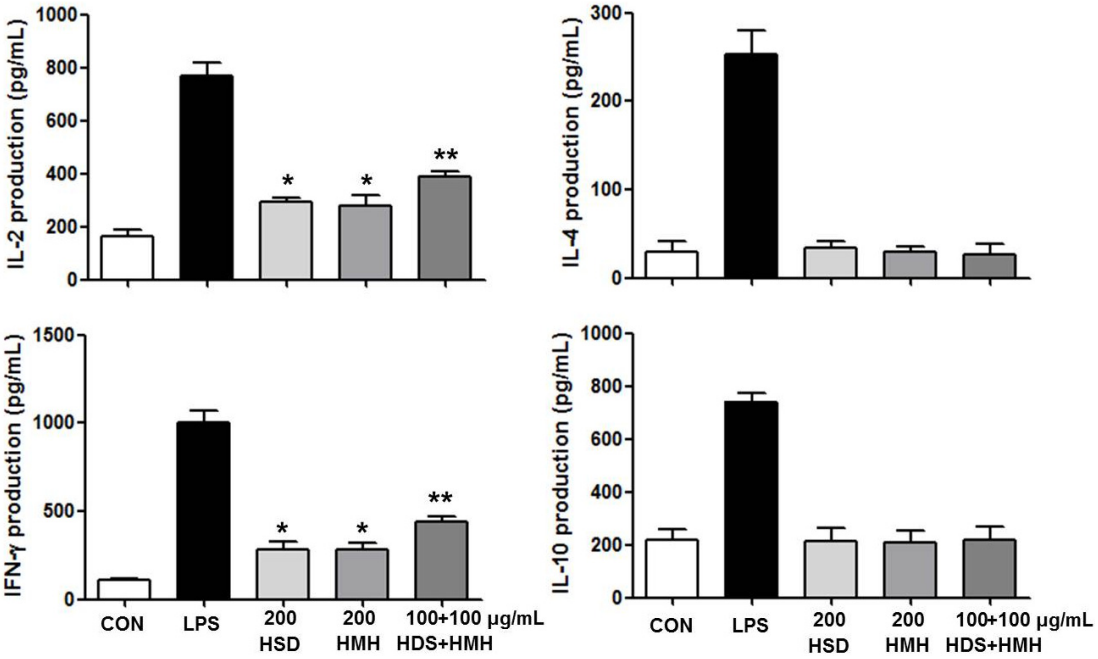

Fig. 7. Cytokine (IL-2, 4, 10, and IFN-γ) production activity of combined treatment of red ginseng extract (HSD) and HemoHIM (HMH) in splenocyte separated from mice. Each samples were treated at the concentration of 200 μg/mL or combined treated at the concentration of 100 μg/mL (HSD and HMH) in splenocyte. Cytokine production was conducted in triplicates (n=3), and the results are expressed as mean±SD. Statistical analysis was performed using the Student's two tailed *t*-test with a significance level of $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$.

IL-2, IFN-γ, TNF-α 등이 있고 Th2 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로는 IL-4, 5, 10, 13이 있으며, 특히 Th1 세포가 분비하는 사이토카인이 증가할 경우 면역활성에 밀접한 관련이 있으며 Th2 세포가 분비하는 사이토카인이 증가할 경우 알레르기 질환이나 아토피 질환의 유발과 밀접한 상관관계가 있다고 보고된다(25). 본 연구에서도 홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리가 비장세포의 사이토카인 분비 특성에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 또는 병용 처리하여 Th1 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인인 IL-2, IFN-γ와 Th2 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인인 IL-4, 10의 분비능에 관하여 측정하였다(Fig. 7). 실험 결과 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 처리한 경우 IL-2 및 IFN-γ와 같은 Th1 세포가 분비하는 사이토카인의 분비가 증가되었으며 병용 처리하였을 경우 더욱더 증가하는 양상을 나타냈다. 또한 홍삼추출물과 생약복합추출물을 각각 또는 병용으로 처리하였을 때 Th2 세포가 분비하는 IL-4 및 IL-10과 같은 사이토카인의 분비량에 대한 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 미루어 보아 홍삼추출물과 생약복합추출물의 경우 알레르기나 아토피 등의 질병 유발과 밀접한 관련이 있는 Th2 세포의 활성화에는 영향을 주지 않는 것으로 판단되며 홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리 시 면역활성과 밀접한 관련이 있는 Th1 세포의 활성화와 관련하여 면역학적인 상승작용을 나타내는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 홍삼추출물(홍삼단)과 생약복합추출물(헤모힘)이 주요 기능성분은 다르지만 면역활성이라는 생리활성 측면에서 동일한 효과를 인정하고 있어서 이들의 병용 처리가 면역세포에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아보기 위하여 수행되었다. 면역활성능에 관한 평가를 진행하기 위하여 마우스의 골수에서 분리한 미분화 골수세포를 선천면역에서 중요한 역할을 수행하는 대식세포 및 수지상세포로 분화시킨 후 홍삼추출물과 생약복합추출물을 병용 처리하였을 때 대식세포 및 수지상세포의 세포 증식능 및 사이토카인의 분비능이 증가되는 것으로 관찰되었다. 또한 활성화된 탐식(면역)세포의 세포 표면에서 발현되는 CD80과 CD86의 발현과 탐식(면역)세포의 항원제시에 밀접한 관련이 있는 주조직적합성 복합체(MHC class Ⅱ)의 발현이 홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리구에서 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었다. 또한 후천면역에서 중요한 역할을 수행하는 면역 T 세포가 다량으로 분포하는 비장 조직으로부터 비장세포를 분리하여 홍삼추출물과 생약복합추출물을 병용 처리하였을 때 세포 증식능 및 면역활성을 유도하는 Th1 세포가 분비하는 사이토카인의 함량이 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 홍삼추출물과 생약복합추출물의 병용 처리는 선천면역뿐만 아니라 후천면역에 관여하는 다양한 면역세포의 활성화에 직·간접적으로 다양한 상승작용을 미치는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. NRF-2012R1A1A2009507) 및 ㈜애터미의 지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cannon JG. 2000. Inflammatory cytokines in nonpathological states. *News Physiol Sci* 15: 298-303.
2. Clerici M, Shearer GM. 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 15: 575-581.
3. Cho YJ, Yoon SJ, Kim JH, Chun SS. 2005. Biological activity of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 446-450.
4. Byrd JC, Park JH, Schaffer BS, Garmroudi F, MacDonald RG. 2000. Dimerization of the insulin-like growth factor Ⅱ/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 25: 18647-18656.
5. Lee JY, Hwang WI, Lim ST. 1998. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines. *Korean J Food Sci Technol* 30: 13-21.
6. Jo SK, Park HR, Jung U, Oh H, Kim SH, Lee ST. 2005. Protective effect of a herbal preparation (HemoHIM) on the self-renewal tissues and immune system against γ-irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 805-813.
7. Park HR, Kim SH, Yee ST, Byun MW, Jo SK. 2005. Effects of a herb mixture (HIM-Ⅰ) on the protection of the hematopoietic-immune system and self-renewal tissues against radiation damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 605-612.
8. Park HR, Ju EJ, Jo SK, Jung U, Kim SH, Yee ST. 2009. Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with HemoHIM in tumor-bearing mice. *BMC Cancer* 9: 85.
9. Shin SH, Kim DS, Kim SH, Jo SK, Byun MW, Yee ST. 2006. Effect of a herbal composition (HemoHIM) on the activation of dendritic cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1322-1328.
10. Baeg IH, So SH. 2013. The world ginseng market and the ginseng (Korea). *J Ginseng Res* 37: 1-7.
11. Yuan HD, Kim JT, Kim SH, Chung SH. 2012. Ginseng and diabetes: the evidences from *in vitro*, animal and human studies. *J Ginseng Res* 36: 27-39.
12. Park JD. 1996. Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng. *Korean J Ginseng Sci* 20: 389-415.
13. Kim YS, Park KM, Shin HJ, Song KS, Nam KY, Park JD. 2002. Anticancer activities of red ginseng acidic polysaccharide by activation of macrophages and natural killer cells. *Yakhak Hoeji* 46: 113-119.
14. Cha JH, Lim EM. 2014. Effects of *Gardeniae fructus* on cytokines in mouse macrophage. *J Korean Obstet Gynecol* 27: 1-16.
15. Ripoll VM, Meadows NA, Raggatt LJ, Chang MK, Pettit AR, Cassady AI, Hume DA. 2008. Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene* 413: 32-41.

16. Lee K, Sohn Y, Lee MJ, Cho HS, Jang MH, Han NY, Shin KW, Kim SH, Cho IH, Bu Y, Jung HS. 2012. Effects of *Angelica acutiloba* on mast cell-mediated allergic reactions *in vitro* and *in vivo*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34: 571-577.
17. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part Ⅱ. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70: 93-103.
18. Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, Kim K, Han SS, Lee CK. 2001. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 1: 1275-1284.
19. Kikuchi T, Ohno N, Ohno T. 2002. Maturation of dendritic cells induced by Candida beta-D-glucan. *Int Immunopharmacol* 2: 1503-1508.
20. Piani A, Hossle JP, Birchler T, Siegrist CA, Heumann D, Davies G, Loeliger S, Seger R, Lauener RP. 2000. Expression of MHC class Ⅱ molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. *Eur J Immunol* 30: 3140-3146.
21. Hegde NR, Chevalier MS, Johnson DC. 2003. Viral inhibition of MHC class Ⅱ antigen presentation. *Trends Immunol* 24: 278-285.
22. Ryu HS, Kim J, Kim HS. 2006. 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.
23. Shan BE, Yoshida Y, Kuroda E, Yamashita U. 1999. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes *in vitro*. *Int J Immunopharmacol* 21: 59-70.
24. Wang JE, Jørgensen PF, Ellingsen EA, Almiöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R. 2001. Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* 16: 178-182.
25. Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-145.