

4주 동안의 울무 추출물 투여가 사이토카인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성과 비장세포 증식에 미치는 영향

류혜숙·*김현숙*

상지대학교 이공대학 식품영양학과, *숙명여자대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effect of Job's Tear (Yul-Moo) Extracts on Mouse Spleen and IL-1 β , IL-6, and TNF- α Cytokine Production by Peritoneal Macrophages

Hye-Sook Ryu and *Hyun Sook Kim*

*Department of Food and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

**Major in Food & Nutrition, Sookmyung Women's University

Abstract

Numerous investigators have studied various activities of natural products and have found that they have not only nutritional effects, but also beneficial properties to cure various diseases and to maintain good health. Job's Tear (Yul-Moo) is a grass crop that has long been used in traditional medicine and as a nourishing food. Although its mechanism of action remains unclear, Job's Tear has been reported to exhibit anti-inflammatory, stomachic, anti-allergic, and anti-spastic effects and has been used in China for the treatment of warts, rheumatism, and neuralgia. Previous results in our laboratory demonstrated that the ethanol extract and the water extract of Job's Tear exerted an immune regulatory function on mice cells *in vitro*. The present study was performed to investigate the *ex vivo* effect of Job's Tear on immune function. Seven to eight weeks old mice (Balb/c) were fed chow diet *ad libitum* and water extract of Job's Tear was administered orally every other day for four weeks at two different concentrations (50 and 500mg/kg B.W.). Splenocytes proliferation with mitogen stimulation with Con A and LPS was enhanced at 50 mg/kg B.W. of Job's Tear compared to those of the control group. The results of this *ex vivo* study showed that proliferation of splenocytes and macrophage activation were seen in the mice orally administrated 50 mg/kg B.W. of Job's Tear water extracts. In conclusion, this study suggests that Job's Tear extracts may enhance immune function by regulating splenocyte proliferation and the cytokine production capacity of activated macrophages in mice.

Key words : splenocytes proliferation, IL-1 β , IL-6, TNF- α , immune

서론

최근 식품을 통한 질병 예방에 대한 관심이 높아지면서 천연 식물 자원을 대상으로 노화 방지, 면역 증

강 효과 등 생리활성 물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다^{1,2)}. 특히 자연식을 통한 건강에 대한 관심이 증대되면서 국내산 잡곡류들에 대한 생리활성 연구가 점차 확대되고 있다. 그러나 국내에서는 주로 현미,

*Corresponding author : Kim, Hyun Sook, Major in Food & Nutrition, Sookmyung Women's University, Chungpha-dong 2-ka, Yongsan-ku, Seoul 140-742, Korea.

Tel : +82-2-710-9469, Fax : +82-2-707-0195, E-mail : rhs7420@hanmail.net

메밀, 울무 등의 생리활성 연구에 대한 연구는 미미한 수준이다^{3,4)}.

울무는 식용과 약용으로 이용되고 있으며⁵⁾, 울무의 면역능에 대한 연구는 미미한 수준이나 기존의 많은 연구에서 밝혀진 생리활성 물질로는 항암 작용 성분인 coixenolide⁶⁾와 유리지 방산⁷⁾, 배란 유발 성분으로 phytosterol 유도체⁸⁾ 혈당 강화 성분으로 glycan인 coixans A, B, C⁹⁾가 알려져 있으며 항보체 활성 성분으로 glucan 및 heteroglucan인 CA-1, CA-2가 알려져 있고¹⁰⁾, 왕겨로부터 trypsin 저해제인 단백질이 분리되었다¹¹⁾. 그 밖에 울무는 항 동맥경화작용¹²⁾이 알려져 있으며 α -amylase 저해제가 분리되었으며¹³⁾ 기능성 식품소재로서의 가능성이 크다.

따라서 본 연구에서는 면역 증진능을 갖는 천연 식품 소재로서의 울무 추출물을 격일로 4주간 경구 투여한 마우스의 비장세포 증식능과 복강 대식세포에서 분비되는 cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량의 변화를 측정하여 울무 추출물이 마우스 면역능에 미치는 영향을 연구하여, 곡류를 이용한 기능성 식품 개발의 가능성을 제시하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 시료추출 및 실험동물

울무 추출물은 동결 건조된 시료(국산, 경동시장)를 증류수 또는 에탄올로 환류 냉각시키면서 80°C 수욕상에서 3시간씩 3회 반복 추출한 후 감압 농축하여 물 추출물을 얻었다.

본 연구에 사용된 동물은 7~8주령 된 암컷 Balb/c mouse를 (주)대한실험동물센터로부터 분양 받아 고형 사료(중앙실험동물)와 물을 자유로이 공급하면서 7~8일 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후 체중이 15 g 내외인 마우스를 실험에 사용하였다. 실험 동물실 온도는 22±2°C, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암 주기(Light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하였다.

2. 시약 및 배지

본 연구에 사용된 배지는 RPMI medium 1640의 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, fetal bovine serum(FBS), lipopolysaccharide(LPS), concanavalin A(ConA), thioglycollate, sodium bicarbonate, ammonium chloride, TRIZMA[®]base, TRIZMA[®]hydrochloride, trypan blue solution(0.4%), DMSO(dimethyl sulfide), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 등의 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO,

USA) 제품을 사용하였다.

3. 울무 추출물의 투여

ex vivo 실험에서는 울무 물 추출물을 멸균 증류수로 용해시킨 후 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 마우스를 임의 배치법에 의해 대조군과 투여군으로 나누었으며, 실험군마다 6마리씩 사용하였다. 대조군에는 생리 식염수를, 투여군에는 검액을 각각 50 mg/kg B.W./day과 500 mg/kg B.W./day씩 4주간 격일로 경구 투여하였다. 시료의 농도와 면역 지표는 Fig. 1과 같다.

4. 마우스 비장세포의 분리 및 배양

마우스 비장세포의 분리는 Mishell 등¹⁴⁾의 방법에 의해 실행하였다. 경추 탈골법으로 희생시킨 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 용액으로 씻은 다음 멸균 유리병으로 가볍게 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 200 mesh stainless steel sieve(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 통과시킨 후 50 mL의 원심관에 넣고 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심시킨 후 cell pellet을 lysing buffer(Tris-buffered ammonium chloride; 0.87% NH₄Cl, pH 7.2)에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 위의 세포는 다시 RPMI로 2회 원심 세척한 다음, 10%FBS RPMI 1640으로 5.0×10⁶ cell/mL의 농도로 희석하여 96-well plate에 90 μ L씩 분주한 후 세포 증식능 측정에 사용하였다.

5. 비장세포 증식능 측정

각 군별로 마우스 비장세포 현탁액을 5.0×10⁶ cell/mL이 되도록 희석하여 96 well plate의 각 well에 90 μ L

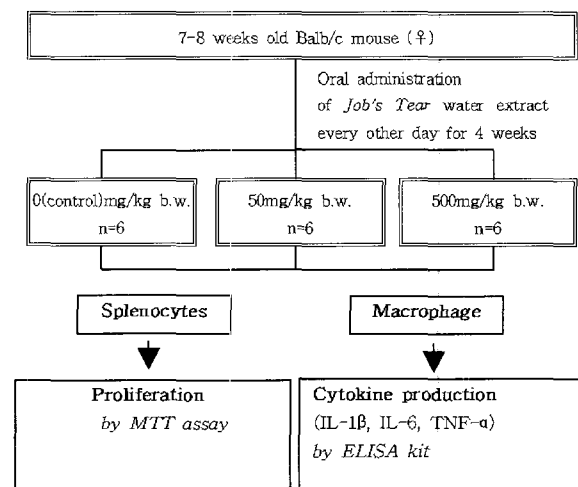


Fig. 1. Study design of *ex vivo* experiment.

씩 분주하고 각 군당 mitogen으로 ConA(5 $\mu\text{g/mL}$), LPS (15 $\mu\text{g/mL}$)를 10 μL 씩 분주하고 대조군에는 배지를 동량으로 분주하였다. 각 plate는 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 incubator(Sanyo)에서 44시간 배양하여 MTT assay를 실시하였다. 배양후 MTT를 10 μL 가하고, 알루미늄 호일로 빛을 차단한 상태에서 4시간 동안 다시 배양한 후 formazan crystal 형성을 유도하였다. 4 $^{\circ}\text{C}$, 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 각 well에 150 μL 의 DMSO를 가하여 10분간 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 비장세포의 증식능은 다음의 공식에 의해 계산되었다.

$$\text{Proliferation Index} = \text{Sample의 흡광도} / \text{Control의 흡광도}$$

6. 마우스 복강 대식세포의 분리 및 배양

실험 3일전 각 군별로 마우스 복강 내에 4% thioglycollate(Sigma) 1.3 mL를 주사하여 복강 대식세포를 모이게 한 후, *in vitro* 실험 중 마우스 복강 대식세포의 사이토카인 생성량 측정 방법과 동일한 방법으로 마우스 복강 대식세포를 분리 및 배양하였다.

7. 마우스 복강 대식세포의 Cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비량 측정

울무 열수 추출물을 경구 투여한 마우스의 복강내 대식세포를 추출하여 배양시킨 다음 배양상층액으로부터 분비되는 cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 분비량을 각각 측정하였다. 즉 10%의 불활성화된 FBS를 함유한 RPMI 1640 용액을 1×10^6 cell/mL의 세포농도가 되도록 분산시켜 24-well plate의 각 well에 1,000 μL 씩 분주하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 incubator(Sanyo)에서 2시간 배양하다 배지 교환을 위해 상층액을 걷고 각 well에 10%의 불활성화된 FBS를 함유한 RPMI 1640 용액을 900 μL , 대식세포를 활성화시키는 mitogen인 LPS와 배지를 100 μL 가한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 incubator(Sanyo)에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액을 분리하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비량을 ELISA cytokine kit(R&D system, USA)를 이용하여 측정하였다.

7. 통계분석

모든 실험 결과의 자료는 SAS(Statistical Analysis System) 통계 프로그램을 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였다. 각 군간의 평균치의 차이는 분산 분석(Analysis of Variance, ANOVA) 및 Duncan's multiple range test를 사용하여 $\alpha = 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 울무 추출물이 마우스 면역 활성에 미치는 영향 : Ex vivo 실험

울무 열수 추출물의 경구 투여가 마우스 비장세포 증식능, 복강 대식세포에서 분비하는 cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량에 어떠한 영향을 미치는지 관찰함으로써 생체 내에서 울무 열수 추출물의 면역 활성 효과를 검증하고자 하였다.

1) 울무 추출물이 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향

비장은 생체 내 면역 방어 기능을 담당하고 있는 이차 면역 기관으로 외부로부터 유입된 항원에 대한 초기 면역 반응을 담당하고 특히 세포성 면역 반응과 체액성 면역 반응에 관여하는 주요 기관이다¹⁵⁾. 또한 T세포, B세포, 대식 세포 등의 여러 가지 림프구가 밀집되어 있는 비장의 크기 및 세포의 수는 면역 반응에 밀접한 관련이 있으므로¹⁶⁾ 면역 증진능을 관찰하기 위한 지표로 이용된다. 본 실험에서도 면역 증진능을 관찰하기 위한 지표로 MTT assay를 이용하여 비장세포 증식능을 측정하였다. MTT assay는 세포 증식능 측정 도구로서 가장 적합한 ³H-thymidine uptake의 결과와 비교적 유사한 것으로 보고되고 있다¹⁷⁾. 비장세포 증식능의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 울무 열수 추출물을 4주 동안 투여한 경우 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day 투여군에서 대조군에 비해 증식능에 큰 변화를 보이지 않았으나, Mitogen에 대한 반응을 보면, 세포성 면역와 관련된 T세포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 Con A 첨가시 4주간의 투여시에 50 mg/kg B.W./day와 500 mg/kg B.W./day 농도군에서 두 농도 모두 대조군에 비해 변화를 보이지 않았다. 그러나 체액성 면역와 관련된 B세포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 LPS 첨가시 50mg/kg B.W./day 투여군에서 대조군보다 높은 증식능을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

2) 울무 열수 추출물의 경구투여와 Cytokine 분비능

대식세포는 사이토카인을 분비하여 면역능을 조절하는데, 외부 항원에 대한 면역반응은 여러 면역세포의 상호작용에 달려 있으며 이러한 세포간의 협력은 사이토카인이라는 단백질이 중재하므로 중재자의 생성과 분비는 중요한 의미를 가지게 된다¹⁸⁾. 사이토카인은 항원과 기타 외부에서 오는 여러 가지 자극에 대하여 한 개체의 세포와 조직들이 유기적으로 작용하도록 도

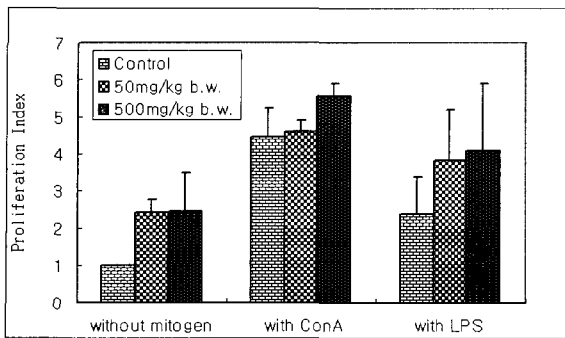


Fig. 2. Proliferation index of splenocyte from mice orally administered with water extract of Job's Tear for 4 weeks.

Spleen cells(5×10^6 cell/mL) were cultured with water or ethanol extracts of Job's Tear on 96-well flat bottomed plates for 48hrs. After culture, degree of splenocyte proliferation was measured by the MTT assay. The data present the mean values \pm S.D. $n=6$. Values are not significantly by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$.

와줄 뿐만 아니라 조절 작용, 면역 반응, 일반적 염증 과정 등을 조절한다고 밝혀져 여러 가지 병리적인 현상과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려졌다¹⁹⁾. 영양과 관련하여 많이 보고된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 주요 사이토카인으로, 특히 여러 종류의 알러지 반응과 자가면역 질환의 발병과 진행에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾.

본 실험에서는 울무 열수 추출물을 50 mg/kg B.W.과 500 mg/kg B.W.의 농도로 경구 투여한 마우스로부터 복강 대식세포를 분리해 낸 다음 활성화된 대식세포가 생성해 낸 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 분비량을 측정하였고 각 군별 양성 대조군으로는 LPS(15 mg/mL)로 자극한 대식세포로부터 분비된 cytokine을 측정함으로써 대식세포의 활성화에 대한 지표로 삼았다.

(1) IL-1 β 분비량

활성화된 대식세포의 지표로 세포배양액의 IL-1 β 의 함량을 ELISA cytokine kit (R&D system, USA)를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 4주 투여군에서 LPS로 처리하지 않은 경우 50 mg/kg B.W.와 500 mg/kg B.W. 농도에서 각각 170.34 \pm 1.24 pg/mL과 36.26 \pm 0.75 pg/mL를 보였으며, LPS를 처리한 경우 50 mg/kg B.W.의 농도에서 186.03 \pm 0.85 pg/mL로 대조군(147.70 \pm 1.32 pg/mL)에 비해 유의적으로 높은 분비를 보였고 500 mg/kg B.W.의 농도에서는 변화를 보이지 않았다. IL-1은 Th cell에 의한 IL-2, IL-4, IFN- γ 등의 생성을 유도시키고 B 림프구가 pre B 림프구로부터 성숙

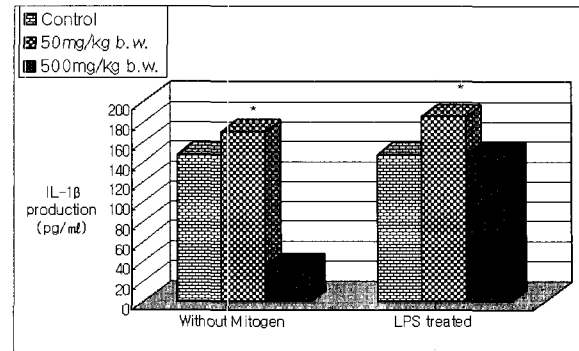


Fig. 3. IL-1 β production by activated peritoneal macrophage of mice orally administered with different levels of Job's Tear water extracts with or without mitogen treatment for 4 weeks.

The data present the mean values \pm SD, $n=6$.

* Significantly different at $p < 0.05$ compared to control.

하는 단계와 항원자극에 의해 증식하는 단계에 직접 또는 Th cell을 경유하여 작용 함으로써 이들의 분화 및 증식을 촉진시킨다^{21,22)}. 따라서 본 실험의 울무 추출물을 경구 투여한 마우스의 대식세포에서 IL-1 β 분비량이 대조군에 비해 유의적으로 증가되어 울무 추출물이 마우스의 복강 대식세포를 활성화하여 IL-1 β 생성을 촉진시킴으로서 면역 증강 효과에 대한 가능성을 제시하는 것으로 사료된다.

(2) IL-6 분비량

대식세포의 활성화에 대한 지표로 세포 배양액의 IL-6 생성량은 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 4주 동안 울무 추출물을 투여한 결과 LPS로 처리하지 않은 경우 50 mg/kg B.W.과 500 mg/kg B.W. 농도에서 127.92 \pm 0.60 pg/mL, 213.60 \pm 1.20 pg/mL로 울무 추출물을 투여하지 않은 대조군보다 낮은 분비량을 보였다. LPS 첨가시에는 50 mg/kg B.W.과 500 mg/kg B.W.농도군에서 각각 1,122.10 \pm 2.28 pg/mL와 959.24 \pm 0.99로 대조군인 926.66 \pm 3.87 pg/mL에 비해 높은 IL-6 분비량을 보였고, 특히 50 mg/kg B.W. 농도군에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 분비능을 보였다. 이는 울무 열수 추출물이 500 mg/kg B.W. 농도에서보다는 50 mg/kg B.W.의 농도에서는 마우스의 복강 대식세포를 활성화시켜 IL-6의 생성을 촉진시킴으로서 면역 기능 증강에 효과가 있으리라 사료된다.

(3) TNF- α 분비량

울무 추출물을 경구 투여하였을 때 복강 대식세포배

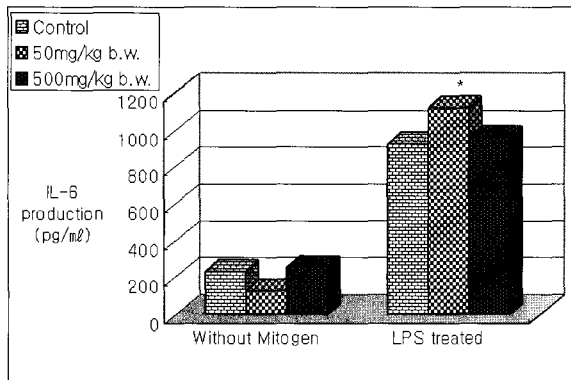


Fig. 4. IL-6 production by activated peritoneal macrophage of mice orally administered with different levels of Job's Tear water extracts with or without mitogen treatment for 4 weeks.

The data present the mean values \pm SD, n=6.

*Significantly different at $p < 0.05$ compared to control.

양액의 TNF- α 생성량은 Fig. 5에 나타내었다. 4주 투여군을 살펴보면 LPS 첨가시에 50 mg/kg B.W.의 농도에서 1,659.57 \pm 12.26 pg/mL로 대조군(1,494.14 \pm 13.33 pg/mL)에 비해 유의적으로 높은 TNF- α 분비량을 나타냈다.

본 실험 결과 율무 열수 추출물을 경구 투여한 경우 50 mg/kg B.W. 투여한 군에서 대조군보다 유의적으로 높은 수준의 TNF- α 가 분비되었다. 이는 율무 열수 추출물의 고농도 보다는 50 mg/kg B.W. 농도로 섭취할 때 면역 활성 성분이 복강 대식세포의 활성화에 작용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

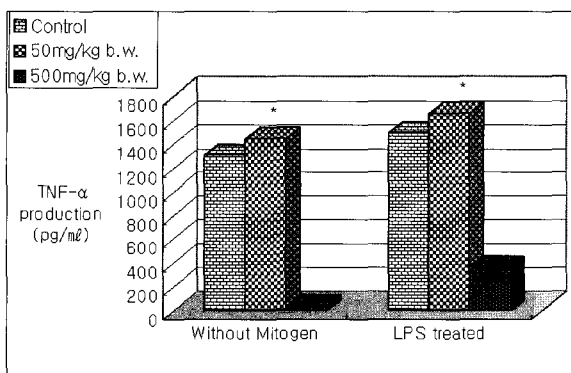


Fig. 5. TNF- α production by activated peritoneal macrophage of mice orally administered with different levels of Job's Tear water extracts with or without mitogen treatment for 4 weeks

The data present the mean values \pm SD, n=6.

*Significantly different at $p < 0.05$ compared to control.

요약 및 결론

본 연구는 천연식품으로부터 면역 증진능을 갖는 식품소재 연구의 일환으로서 율무 면역 증강 효과를 검색하고자 하였다. 율무 열수 추출물을 4주간 격일로 체중 kg당 50 mg/kg B.W.과 500 mg/kg B.W.의 두 농도로 각각 마우스에 경구 투여한 후 비장세포 증식능과 활성 복강 대식세포에서 분비하는 사이토카인 분비능을 측정하였다. 그 결과 율무 추출물 투여군 50 mg/kg B.W. 농도에서 비장세포 증식능 효과를 보였으나, 유의성은 보이지 않았다. 한편 활성 복강 대식세포에 의한 사이토카인 분비량을 측정한 결과 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 모두 50 mg/kg B. W. 농도에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 50 mg/kg B. W. 농도의 율무 추출물 경구 투여시 마우스 비장세포 증식능과 사이토카인 분비능에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이는 율무 추출물의 50 mg/kg B. W. 농도의 투여가 마우스 비장세포의 증식과 대식세포의 활성화를 유도함으로써 면역 기능을 증강시킬 수 있는 가능성이 있음을 시사하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2004년도 상지대학교 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Wagner, H. Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity. *Pure & Appl. Chem.* 66(7):1271. 1990
2. Lee, JS, Shin, YJ, Lim, HJ, Choi, WE and Lee, YK. Antitumor and antimutagenic effect of protien polysaccharides from *Polyporus umbellatus*. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 33:475-470. 2004
3. Pyo, MY and Su, MH. Effects of *Phellinus linteus* extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. *Journal of Applied Phamcology* 9:194-200. 2001
4. Park, JS and Chyun, JH. Effects of low fat diet and saturated fat supplementation on the immune status of BALB/c mouse. *Korean J. Nutrition* 26(5):578-585. 1993
5. Yoo, TJ. Sikpoombogam. Moonundang, Seoul, 288-290. 1998

6. Tanimura, A. Studies on the anti-tumor component in the seeds of *Coix lachryma jobi* L. var. ma-yuen Stapf. II. The structure of coixenolide, *Chem. Phar. Bull.* 9: 47-53. 1961
 7. Numata, MA, Yamamoto, M and Yamada, H. Anti-tumor components isolated from the Chinese herbal medicine *Coix lachryma-jobi* L. *Planta Med.* 60 : 356-359. 1994
 8. Kond, YK, Nonno, C and Hikino, H. Isolation of ovulatory-active substances from crops of Job's tears (*Coix lachryma jobi* L. var. ma-yuen Stapf). *Che. Pharm Bull.* 36 : 3147-3152. 1998
 9. Takahashi, M and Konno, CH. Isolation and hypoglycemic activity of coixans A, B and C glycans of *Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf seeds. *Planta Med. Fed.* 1: 64-65. 1986
 10. Yamada, H, Yanahira, S, Kiyohara, H, Cyong, JC and Otsuka, Y. Water-soluble glucans from the seed of *Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen seeds. *Phytochem.* 25: 129-132. 1986
 11. Ary, MB, Shewry, PR and Richardson, M. The amino acid sequence of a cereal Bowman-Birk type trypsin inhibitor from seeds of job's tear. *FEBS Lett.* 229: 111-118. 1988
 12. Park, Y, Suzuki, H and Lee, YS. Effect of coxi on plasma, liver and fecal lipid components in the rat fed on lard or soybean oil-cholesterol diet. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 39 : 7-1. 1988
 13. Ary, MB, Richardson, M and Shewry, PR. Purification and characterization of an insect alpha-amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's tears *Biochim. Biophys. Acta* 999:260-266. 1988
 14. Mishell, BB and Shigi, SM. Selected methods in cellular immunology. 1st ed. San Francisco. WH Freeman and Co. 4. 1980
 15. Choi, SE. Effect of needle extracts on mouse splenocyte proliferation and cytokine production by activated mouse peritoneal macrophage. Master's thesis. Sookmyung Women's University. 2000
 16. Lee, YS. Effect of bark Extract on Modulation of Immunocompetence and Irradiation-induced Inflammation Response in Mice. Ph.D. Dissertation Sookmyung Women's University. 2003
 17. Moon, EY, Park, SY and Park, EK. Influence of *Angelicae Gigantis Radix* on the immune system. *Kor. J. of Immunol.* 13 : 191. 1991
 18. Wichmann, MW, Ayala, A and Chaudry, IH. Male sex steroid are responsnsble for macropage immune function after trauma-hemorrhage, The American Physiological Society, C1335-C1340. 1997
-
- (2006년 4월 12일 접수일; 2006년 5월 25일 채택일)