

## Propolis extracts가 양식넙치의 면역활성능에 미치는 영향

남현주 · 박경일 · 최민순<sup>†</sup>

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

### Effects of propolis extracts on the immune response in cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*

Hyun ju Nam, Kyung Il Park and Min soon Choi<sup>†</sup>

Dept. of Aquatic Life Medicine Kunsan National University, Kunsan, 573-400, Korea

Propolis is a beehive product with a very complex chemical composition, widely used in folk medicine because of its several therapeutic activities. This study was conducted to measure the efficacy of propolis on non-specific defense reactions, specific immune response, and protection levels against pathogen challenge with *Streptococcus iniae*. in vitro and in vivo. In vitro, the phagocytic activity and NBT assay of peripheral blood leukocytes (PBL) were evaluated in a various propolis extracts concentrations (0, 10, 50, 100, 150, 250 and 500 µg/ml). The optimal concentration showing activation of propolis extracts was determined to 100 µg/ml. In vivo, they were divided into four groups (PBS, propoli extractss, vaccine, propolis extracts + vaccine) in vivo. Fish were received i.p. injection of either PBS or propolis extracts, and in the presence or absence of formalin inactivated *S. iniae* ( $1 \times 10^8$  CFU/fish), respectively. The level of haematocrit is not affected among experimental groups. The phagocytic activity and the NBT reduction activities of head kidney phagocyte were markedly ( $p < 0.05$ ) augmented in the propolis extracts groups than in the PBS-control group, respectively. The level of serum lysozyme activity was significantly ( $p < 0.05$ ) increased in the propolis extracts treated groups than in the PBS-control group. The agglutinin titer was significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced in the vaccine+propolis extracts group than in the vaccine group, but there was no difference between PBS-control and propolis treated group. The results of the present study suggest that propolis extracts seems to be a promising compounds of non-specific immune stimulator, also being able to use a good adjuvant.

Key words: propolis, NBT, phagocytosis, lysozyme, antibody

국내의 양식넙치산업에서 문제시 되고 있는 연쇄구균증은 주로 어체의 성장이 빠른 고수온기인 하절기에 매년 발생하기 때문에 넙치양식어가에

심각한 경제적 부담을 초래하고 있다. 본 증의 원 인체는 *Streptococcus iniae*로서 그람양성세균의 β-용혈성을 보이며, 이환된 어체는 외관상 채색흑화, 안구백탁, 복부종대 및 탈장증상을 보이는 것이 특징이다(Kim *et al.*, 2005; Baeck *et al.*, 2006; Angew and Barnes 2007). 본 증의 예방 및 치료를 위해서 주로 항균요법에 의존되어지고 있다. 그렇지만 과

<sup>†</sup>Corresponding author: Min-Soon Choi  
Tel: +82-10-6747-1883, Fax: +82-63-469-7444  
E-mail: Choims@kunsan.ac.kr

도한 약제의 빈번한 사용은 약제 내성균의 확산으로 치료에 어려움을 증가시킬 뿐만 아니라, 어체에 약제의 잔류로 인해서 공중보건학적으로도 매우 심각한 문제로 지적되고 있다(Barton and Iwama, 1991; Iwama *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010).

이러한 이유로 최근에는 경제적이면서 부작용이 적은 미생물유래의 lipopolysaccharide 및 Peptidoglycan/MDP, 약용-식용식물 유래의  $\beta$ -1,3-D-glucan, polysaccharide 및 Aloe 추출물 그리고 합성계제인 levamisole등을 이용한 어체의 비특이적 면역증강을 통한 질병예방효과가 매우 긍정적으로 평가되고 있다(Ingram, 1992; Jia and Wu., 1993; Sakai, 1999; Kim *et al.*, 1999). 통상적으로 식용 및 약용의 천연산물들이 양식 어체의 면역증강제로서 활용되기 위한 조건으로서는 어류 체내에 독성작용이 거의 없을 것, 환경 친화적인 뿐만 아니라, 증체울 향상과 더불어 탁월한 생리활성 작용을 필요로 한다(Burdock, 1998; Stahl, 1992; Kim *et al.*, 1999; Jia & Wu 2004).

한편, propolis extracts는 식물 유래의 300여종의 다양한 성분들이 꿀벌에 의해서 변조된 수지성화합물이 90%를 차지하며, 꽃가루 등의 에스테르류, 유기물과 미네랄등이 5%등으로 구성된 혼합물질로 알려져 있다. 이들 혼합성분들은 항미생물, 항종양 및 항염 등의 효과적인 것으로 알려져 있다(Bankova, 2005 a,b). 최근 포유류 및 가금등을 대상으로 비특이적 면역증강 물질로써 활용 가능성이 매우 긍정적으로 평가 되고 있다. (Dobrovolski *et al.*, 1991; Cuesta *et al.*, 2005; Sforcin, 2005; Chu, 2006). 더욱이 propolis extracts가 천연산물로써 환경 친화적이며, 섭취 후에 독성이 거의 없기 때문에 면역활성물질로써 이상적으로 사료된다.

이에 본 실험에서는 양식넙치를 대상으로 propolis extracts의 면역증강효과에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시험어

본 실험에 사용된 넙치 *Paralichthys olivaceus*(약

50 g)는 전북 부안에 소재한 군산대학교 부속 해양 연구원에서 사육중인 넙치를 산소공급 조절 장치가 부착된 수조 운반차량을 이용하여서 1 ton 원형의 FRP 수조에 수용하였다. 전 실험기간 동안의 평균 사육수온은  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  범위로 유지하였고, 환수는 1일 2회 수량의 1/3정도를 환수 하면서 필요에 따라 수온유지를 위해 heater를 사용하였다. 사료는 넙치용 EP(주; 우성사료)사료를 어체 중량의 2%를 1일 2회 급이 하였다.

### 세균불활화 백신제조

백신제작은 국립수산진흥원으로부터 분양받은 *Streptococcus iniae* (*S. iniae*, JSL0208)를 이용하였다. 증균은 균주를 1.5% NaCl이 첨가된 BHI broth (Difco, USA)에 접종하여 water bath( $30^{\circ}\text{C}$ , 48 h)로 진탕 배양하였다. 균액의 불활화는 10% 중성포르말린(Sigma)을 증균 배양액의 3%가 되도록 첨가하여 18시간 처리하였으며, 배양 균액의 일부를 BHI agar(Difco, USA)에서 접종 배양시 비 발육상태를 확인하였다. 백신으로 사용할 균액은 불활화시킨 균액을 원심분리( $10000\times\text{g}$ , 10분)하여 상정액을 제거하고 멸균 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)로 3회 세정한 다음 비색계(Schmazuе, Japan)를 이용하여  $\text{OD}_{630\text{nm}}$   $1.0(5 \times 10^9 \text{ CFU/ml})$ 농도로 제조하였으며, 제조한 균액을 냉장보존( $4^{\circ}\text{C}$ )하면서 사용하였다.

### Propolis 수용액

propolis의 추출은 Sforcin(2005)의 방법에 준하여 시행하였다. 간기하면 구입한 프로폴리스(30 g)를 증류수를 첨가하여 총량이 100ml이 되게 균질화 희석시킨 추출물을 여과후에 evaporation을 시킨 후  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동상태에 보존하였다. 한편, 필요에 따라서 propolis extracts를 PBS로  $45^{\circ}\text{C}$  수조에서 용해시킨 후 0.45  $\mu\text{l}$  filter 여과 멸균하여 사용하였다.

### Zymosan 흡소닌화

Zymosan(0.02 g, Sigma)을 FBS 1 ml를 첨가하여  $25^{\circ}\text{C}$ , 30분간 반응시켰다. 반응시킨 zymosan을 원심분리( $350 \times \text{g}$ , 10 min) 상정액을 제거하였다. 흡소닌화된 zymosan을 L-15배지로 세정 후 상정액을

버리고 nitroblue terzolium(NBT, Sigma) 1 mg/ml로 조정된 NBT용액을 L-15배지에 넣어 총 10 ml 되게 하였다.

#### *In vitro*에서 말초혈액백혈구의 활성능

*In vitro*에서 propolisextracts 의 농도차(0, 10, 50, 100, 150, 250 및 500 µg/ml)에 따른 식세포의 활성능을 조사하기 위해서 양식넙치의 peripheral blood leukocytes(PBL)의 phagocytosis 및 NBT reduction 조사를 하였다. 이때 사용한 어체는 5마리였다.

#### PBL의 분리 및 propolis처리

PBL의 분리 및 활성능 측정은 Anderson *et al* (1992)의 방법에 준하였다. 즉 양식넙치를 MS-222로 마취 시킨 후에 헤파린 처리 주사기를 이용하여서 미정맥으로부터 채혈하였다. 멸균 커버글라스 (22 × 40 mm, marienfeld)위에 채혈한 혈액을 0.2 ml 과 propolis extracts를 농도별(0, 10, 50, 100, 150, 250 및 500 µg/ml)로 0.2 ml을 첨가하여 22°C의 humidity chamber에서 1시간 배양 후에 적혈구 및 비부착 세포들을 PBS로 세정하였으며, 여과지로 과다한 세정액을 제거 하였다.

#### NBT 및 식균능 측정

NBT 측정은 멸균된 슬라이드 글라스위에 0.2% NBT(sigma)용액 0.2 ml을 적하시킨 후 상기와 같이 준비된 백혈구부착 커버글라스를 거꾸로 올려 놓은 다음 습윤 배양기에서 2 hrs 반응시켰다. 광학 현미경(400 X)으로 formazan 형성한 백혈구를 검정하였다(n=200). 이때 3반복으로 측정하였다. 한편, 식균능의 측정은 백혈구 부착 커버글라스에 *S. iniae*( $1 \times 10^7$  CFU/ml)액을 0.2 ml을 적하시킨 후 습윤 배양기에서 3 hrs 반응시킨 다음 실온에서 건조시킨 다음 Wright 염색을 시행 한 후 식균된 세포를 관찰해서 탐식율을 산출했다(n=200). 이때 3반복으로 측정하였다.

Formazan assay(%)=(Formazan 형성세포/관찰한 식세포 수) × 100

식균율(%)= (*S. iniae* 식균된 세포수/관찰한 식세포 수) × 100

#### *In vivo*에서 어체내 백신 및 Propolis extracts의 처리

불활화 균액 및 propolis 처리는 Chu *et al*(2006) 및 Cuesta *et al*(2005)의 방법을 보완하여 사용하였다. 즉 실험구는 4개구(PBS구, propolisextracts 구, vaccine단독구, vaccine+propolis extracts혼합구)로 구분하였으며, 각 실험구당 5마리 넙치를 사용하였다. 어체를 MS-222(Sigma)로 충분히 마취시킨 후 어체의 내부 장기에 손상이 가지 않도록 1회용 주사기를 이용하여 단독 또는 혼합한 용액 0.2 ml을 어체 복강 내에 주사하였다. 이때 어체내 투여 농도는 균액( $1 \times 10^8$  CFU/fish) 및 propolis extracts (100 mg/kg) 농도가 되도록 조정하였다. 한편, 접촉한 어체를 사육조에 옮겨서 가급적 스트레스를 받지 않도록 사육하면서 백신접종 2주 후에 어체를 희생하였다.

#### 두신세포의 분리

두신세포의 분리는 Secombes(1990)의 방법에 따랐다. 어체를 MS-222로 마취시킨 후에 두부를 절단하여서 희생시켰다. 두신 대식세포의 식작용능을 측정하기 위하여 넙치의 복부를 절개하여 두신을 무균적으로 10 cm의 petri dish(Corning, USA)분리하였다. 분리된 두신을 무균가위로 세절하고 멸균 슬라이드로 teasing한 후, nylon mesh를 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 사용한 배지는 penicillin/streptomycin(Sigma) 100 units/ml 및 heparin (Sigma) 10 units/ml 등을 함유한 L-15배지(Sigma)이었다. teasing한 세포 현탁액을 35%와 51% 농도의 percoll 용액이 들어있는 15 ml 원심튜브(Corning, USA) 위에 조심스럽게 중층 시킨 다음 원심 분리(450 × g, 30분간)하여 백혈구층만을 조심스럽게 회수한 후 PBS(pH 7.2)로 3회 세정하였다. 이때의 세포의 생존율은 0.3% trypan blue (Sigma)로 확인 시 95% 이상을 보였다. 분리된 세포를 L-15배지를 함유한 petri dish(Corning, USA)에  $5 \times 10^7$  cells/ml로 조정하여 22°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 3시간 배양 하였다. 부착되지 않은 세포는 PBS로 3회 세척 제거하여 부착세포만을 식세포로 이용하였다. 한편 분리한 세포를 penicillin/ streptomycin-100 units/ml 및 2% fetal bovine serum(FBS,

Gibco)를 함유한 L-15배지(L-15 완전배지)에  $5 \times 10^6$  cells/ml 로 조정하여 필요에 따라 사용하였다.

### Hematocrit치 측정

Hematocrit치는 micro capillary 방법으로 측정하였다. 어체를 MS-222(Sigma)에 마취시킨 다음 heparin(5,000 IU, Sigma)처리한 멸균 플라스틱 주사기로 넙치의 미부 정맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액을 시판 capillary tube(Chase Inc. USA)에 흡입하여 봉인 한 다음 hematocrit측정용 원심기를 이용하여 (10,000 rpm로 5 min.) 측정하였다. hematocrit치는 전체혈액량에 대한 적혈구의 비율을 백분율(%)로 환산하였다.

### 항체가 측정

응집 항체는 microtiter 법으로 측정하였다 (Roberson 1990). 즉, 백신균액 접종 후 2주째에 어체를 MS-222로 마취시킨 후 1회용 주사기를 이용하여 미부정맥에서 채혈하여 냉장고에 2 h 정지 후 원심분리(400 × g, 15min)하여 혈청을 분리하였다. 96 well plate(Corning, USA)에서 넙치로부터 분리한 혈청 50 μl를 멸균생리 식염수를 이용하여 2 배 계열희석 한 후, formalin 불활화 항원을 50 μl씩 반응시킨 후, 24시간 후에 응집반응 결과를 확인하였다.

### Lysozyme 측정

혈청 lysozyme의 활성은 Swicki and Studnicka (1987)의 방법에 준하여 turbidimetric assay로 분석하였다. 즉 냉동 건조된 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) 균체를 0.2 mg/ml (W/V)의 농도로 50 mM phosphate buffered saline(PBS, pH 6.2)에 현탁하여 기질로 사용하였다. 균체가 함유된 기질 800 μl에 측정용 시료인 혈청 100 μl를 첨가후, 0.5분과 10분에 540 nm에서 흡광도를 각각 측정하였으며, 1분당 0.001의 흡광도 감소를 가져오는 lysozyme의 활성 값을 1 unit로 표시하였다.

### 두신 대식세포 탐식능 측정

탐식능의 표적세포는 *Streptococcus. iniae* (*S. iniae*) 균주를 이용하였다. 즉 배양기에 48시간 배양

후 PBS(pH 7.2)로 3회 원심(500 × g, 10 min)하여 균 농도를  $1 \times 10^9$  CFU/ml로 조정 후 사용하였다. 식세포와 표적세포를 각각 동량(0.5 ml) 혼합 하여 3시간 배양 후 각 well을 PBS로 3회 세정 후 100% methanol로 고정한 후 Wright 염색 후 광학현미경으로 200개의 대식세포를 관찰해서 탐식율을 산출했다.

식균율(%)= (*S. iniae*를 탐식한 대식세포/관찰한 대식세포 수) × 100

### 두신 대식세포의 활성산소 변화 측정

두신 대식세포의 활성 산소 변화 측정은 Baulny *et al.*(1996)의 방법에 준하여 nitroblue tetrazolium (NBT) reduction 방법으로 측정하였다. 즉 96 well 에 대식세포( $5 \times 10^6$  cells/ml) 및 옥소닌화된 zymosan이 함유된 NBT용액을 동량(100 μl) 첨가하고 22 °C에서 2 hrs 반응시켰다. 그 후 상청액을 버리고 PBS로 2회 세정한 다음 100% methanol로 10분간 고정시켰다. 고정된 세포를 70% methanol로 2회 세정한 후 건조하고 각 well에 2 M KOH(Sigma) 용액 120 μl와 dimethyl sulphoxide(DMSO, Sigma) 140 μl를 첨가하여 formazan을 녹이고 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 blank는 2 M KOH와 DMSO의 혼합용액을 사용하였다.

### 생존율 조사

생존율의 측정은 4개 처리구(PBS구, propolis extracts구, vaccine구 및 Vaccine+propolis extracts 혼합구)로 구분하여 각 군마다 12마리의 넙치를 이용하였다. 즉 각 실험구별 처리액 0.2 ml을 넙치 복강에 주사 후 2주째에 BHIB에서 증균한 대수증식기 *S. iniae* 균액을 멸균 PBS에 현탁 하여 균 농도를  $1 \times 10^9$  CFU/ml로 조정하였다. 각 실험구별로 균액을 어체 복강에 0.1 ml씩 주사 한 후 10일 동안 생존율을 조사하였다.

### 통계학적 유의성 검증

대조구와 각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's *t-test*로 검정하였으며,  $P < 0.05$  일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### *In vitro*에서 propolis extracts가 넙치의 혈액 백혈구(PBL)의 활성능에 미치는 영향

*In vitro*에서 propolis extracts농도 차(0, 10, 50, 100, 150, 250 및 500  $\mu\text{g/ml}$ )에 따른 PBL의 탐식능 및 NBT 환원능에 미치는 영향을 조사하였던 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 propolis extracts농도 50~150  $\mu\text{g/ml}$  범위대에서 PBL의 탐식능 및 NBT 환원능이 대조구에 비해서 유의성 있게 증가를 보였으며, 특히 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 활성이 높았다. 그렇지만 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해서 오히려 활성이 감소되었다. 따라서 *in vivo* 실험시 propolis extracts최적 투여농도를 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 선정하였다.

### *In vivo*에서 propolis가 넙치의 면역반응에 미치는 영향

#### 1) Hematocrit(Ht)치 측정

hematocrit치의 변화를 조사한 결과, PBS를 처리

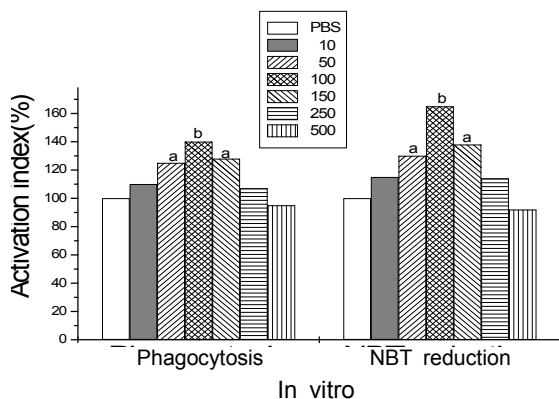


Fig. 1. The effect of propolis extract on the peripheral blood leukocyte(PBL) activities in cultured flounder. PBL were incubated in PBS or with various concentrations propolis extract(0, 10, 50, 100, 150, 250 and 500  $\mu\text{g/ml}$ ) for 2 hrs at 22 $^{\circ}\text{C}$ . The phagocytosis of bacteria were determined by counting 200 PBL and expressed phagocytic index compared to control. NBT reduction was evaluated by formazan forming cells counting(n=200). Activation index are normalized to the values obtained from PBS control and expressed as means of triplicate readings. Statistical differences are indicated by letters. a:  $P<0.05$ , b;  $P<0.01$ .

한 대조구는  $30\pm 3.5\%$ , propolis extracts 처리구는  $29.5\pm 1.6\%$ , vaccine단독 처리구는  $31\pm 3.7\%$  propolis+vaccine extracts 혼합 처리구는  $29\pm 3.4\%$ 로 대조구에 비해서 Ht치가 약간 감소되는 경향을 보였으나 유의적 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

#### 2) Lysozyme 활성 측정

혈청 lysozyme의 용균활성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 대조군의 경우  $145\pm 11$ 치를 보인 반면에 propolis extracts 처리군에서는  $178\pm 13$ 치로 유의성 있게 높았다. 한편, vaccine단독군의 경우는  $205\pm 14$ 치를 보인반면에 vaccine+propolis extracts 혼합 처리구의 경우에는  $276\pm 18$ 로 유의성 있게 높게 나타났다(Fig. 3).

#### 3) 두신 대식세포 탐식능 측정

대식세포 탐식능을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. PBS처리군에서  $33.2\pm 1.2\%$ 를 보인 반면에 propolis extracts 처리군의 경우 탐식능이  $42.9\pm 1.3\%$ 로 유의성이 인정되었다. 한편, vaccine단독처리구의 경우 탐식율이  $47.8\pm 2.2\%$ 인데 비해서 prop-

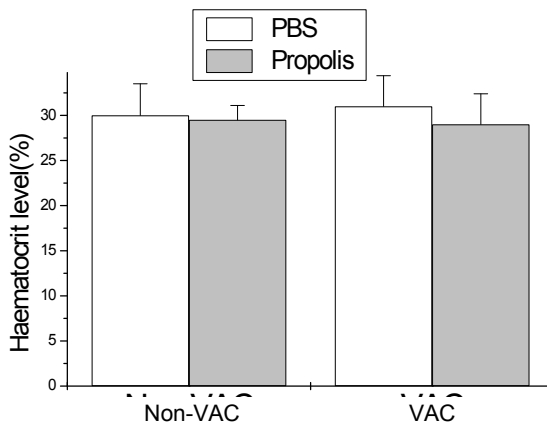


Fig. 2. The effect of propolis extracts -treatment on the level of haematocrit value in cultured flounder. They were divided into four groups(PBS, Propolis extracts, Vaccine, Propolis extracts + Vaccine). Each groups (5 fish/group) of fish were received i.p. injection of either PBS or 100 mg/kg of propolis extracts, and in the presence or absence of formalin inactivated *S. iniae* ( $1\times 10^8$  CFU/fish), respectively. Results are expressed as the means $\pm$ SD. of triplicates readings.

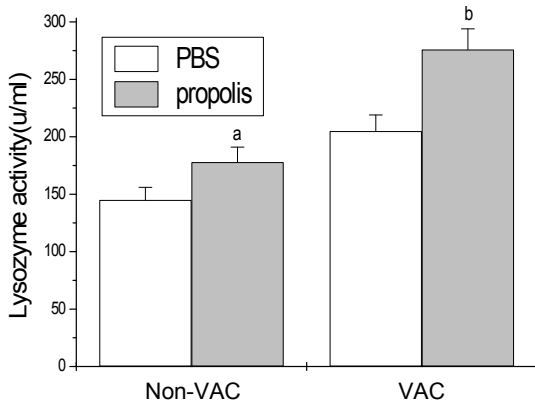


Fig. 3. The effect of propolis extracts -treatment on the lysozyme activity. They were divided into four groups (PBS, Propolis extracts, Vaccine, and Vaccine + Propolis extracts) Each groups(5 fish/group) of fish were received i.p. injection of either PBS or 100 mg/kg of propolis extracts, and in the presence or absence of formalin inactivated *S. iniae* ( $1 \times 10^8$  CFU/fish), respectively. Results are expressed as the means $\pm$ SD of triplicate readings. Statistical differences ( $P < 0.05$ ) are indicated as a, when compared to PBS-injected and b, when compared to vaccine treated.

olis extracts+vaccine 혼합 처리구에서는  $57.8 \pm 2.6\%$ 로 유의성 있게 높았다(Fig. 4).

#### 4) 두신대식세포 활성산소 생성능 측정

두신 대식세포의 대한 반응기산소 활성치를 Nitroblue tetrazolium(NBT) 환원 후 OD 값을 측정 한 결과, PBS 처리구의 경우  $0.24 \pm 0.01$ 치에 비하여 Propolis 처리 경우에는  $0.31 \pm 0.02$ 치로 유의성이 인정되었다. 한편, vaccine 처리구의 경우  $0.36 \pm 0.02$ 치를 보인 반면에 propolis extracts +vaccine 혼합 처리구에서는  $0.44 \pm 0.02$ 치로 유의성 있게 높았다 (Fig. 5).

#### 5) 응집항체가 측정

응집항체가의 변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. PBS 및 propolis extracts 처리구에서는 각각  $2^{1.6} \pm 0.1$  및  $2^{1.6} \pm 0.2$ 로 차이가 인정되지 않았다. 한편, vaccine 단독 처리구의 경우 응집항체가가  $2^{5.6} \pm 0.5$ 이었으나, vaccine+propolis extracts 혼합 처리구에서는  $2^{7.8} \pm 0.6$ 으로 유의성이 인정되어졌다(Fig. 6).

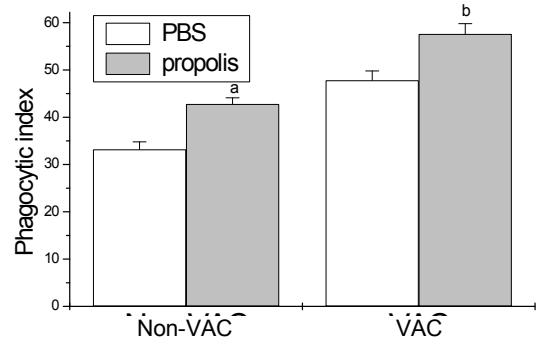


Fig. 4. The effect of propolis extracts -treatment on the phagocytosis. They were divided into four groups (PBS, Propolis extracts, Vaccine, Propolis extracts + Vaccine). Each groups (5 fish/group) of fish were received i.p. injection of either PBS or 100 mg/kg of propolis, and in the presence or absence of formalin inactivated *S. iniae* ( $1 \times 10^8$  CFU/fish), respectively. Results are expressed as the means $\pm$ SD of triplicate readings. Statistical differences ( $P < 0.05$ ) are indicated as a, when compared to PBS injected and b, when compared to vaccine treated.

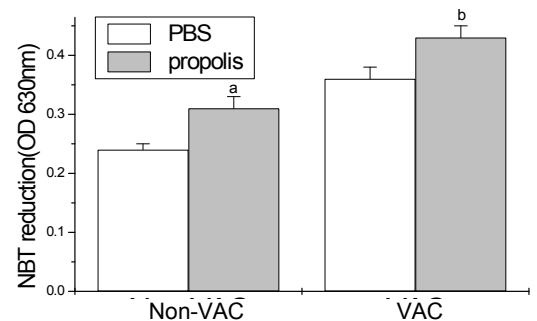


Fig. 5. The effect of propolis extracts -treatment on the NBT reduction. They were divided into four groups (PBS, Propolis extracts, Vaccine, Propolis extracts+ Vaccine). Each groups (5 fish/group) of fish were received i.p. injection of either PBS or 100 mg/kg of propolis, and in the presence or absence of formalin inactivated *S. iniae* ( $1 \times 10^8$  CFU/fish), respectively. Results are expressed as the means $\pm$ SD of triplicate readings. Statistical differences ( $P < 0.05$ ) are indicated as a, when compared to PBS injected and b, when compared to vaccine treated.

#### 6) 어체 생존율 조사

넙치의 연쇄구균에 대한 항병력에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 대조구의 경우 생

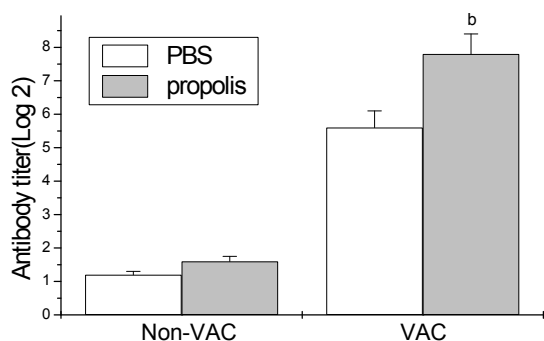


Fig. 6. The effect of propolis extracts-treatment on the induction of antibody production in cultured flounder. They were divided into four groups (PBS, Propolis, Vaccine, Propolis extracts + Vaccine). Each groups (5 fish/group) of fish were received i.p. injection of either PBS or 5 mg/kg of propolis extracts, and in the presence or absence of formalin inactivated *S. iniae* ( $1 \times 10^8$  CFU/fish), respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD of triplicate readings. Statistical differences ( $P < 0.05$ ) are indicated as b, when compared to vaccine treated.

존율이 22%에 비해 propolis extracts 구는 46%, vaccine 단독구의 경우 생존율이 72%이었으나, vaccine+propolis extracts 혼합 처리구는 86%의 생존율을 보였다(Fig. 7).

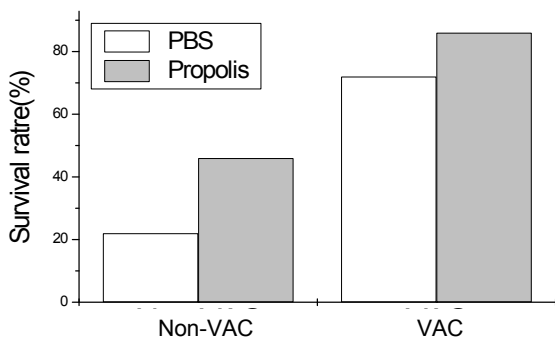


Fig. 7. The effect of propolis extracts-treatment on the survival rate for 10 days post challenges. They were divided into four groups (PBS, Propolis extracts, Vaccine, Propolis extracts + Vaccine). Each groups (12 fish/group) of fish were received i.p. injection of either PBS or 5 mg/fish of propolis extracts, and in the presence or absence of formalin inactivated *S. iniae* ( $1 \times 10^8$  CFU/fish), respectively. Results are expressed as the means of triplicate readings.

## 고 찰

어체내에 생리활성물질을 투여하는 경우에 어류의 면역체계 중에서도 세포성 면역의 증강을 유도되어진다. 이들 물질의 투여에 의한 어체의 면역증강효과는 비특이적 면역 반응 활성을 통하여 부수적으로 특이적 면역반응 또한 활성화시킴으로써 어류의 항상성을 유지시키게 된다(Niki *et al.*, 1993; Secombes, 1996). 본 실험(*in vitro*)에서 propolis extracts 농도차에 따른 PBL의 탐식능 및 NBT 환원능을 조사하였던 바 propolis extracts의 50 ~ 250  $\mu\text{g/ml}$  범위대에서 PBS 처리구에 비해서 활성능이 유의적으로 증가를 보였으며, 그중 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 높았다(Fig. 1). 이러한 결과를 근거로 넙치 복강내 propolis extracts 적정처리 농도는 어체당 100 mg/kg 으로 선정하였다.

lysozyme은 주로 백혈구, 혈장 및 체표면 등에 넓게 분포되어있는 효소로서 세균 세포벽 성분 중의 peptidoglycan의  $\beta$ -1,4-glycoside 결합을 가수분해하여 용균효과를 나타내며, 보체나 식세포 등과 협력하여 살균 및 용균반응을 강화시켜서 생체방어를 증강시키는데 중요한 역할을 수행한다(Fletcher and White, 1976; Takahashi *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1992; Paulsen *et al.*, 2002). 한편, *in vivo*상에서 propolis 처리 유무(PBS, Propolis, Vaccine, Propolis + Vaccine)에 따른 lysozyme의 활성치를 조사 하였던 바 propolis 처리구는 대조구에 비해서 lysozyme 활성능이 유의적으로 증가 되어졌다(Fig. 2). 한편, lysozyme의 활성이 그람양성세균보다는 그람양성세균에 효과적이란 점으로 미루어 볼때 propolis extracts가 양식넙치의 새균성 고질병의 하나인 연쇄구균증의 예방을 위한 유용하게 활용되어 질 것으로 평가되어진다.

대식세포는 체내에 침습한 다양한 미생물에 대하여 식작용 및 살균작용 등을 수행함으로써 생체의 방어 작용에 직접 및 간접적으로 중요한 역할을 수행한다(Stahl 1992; Secombes, 1996). 식세포에 의해서 탐식된 외부 병원체에 대한 주요 살균작용은 식세포의 활성산소( $\text{O}_2$  radical)의 작용에 의해 이루어진다. 즉, 외부의 병원체가 숙주의 식세포 막을 자극하면  $\text{O}_2$ 로부터 형성된  $\text{O}_2^-$ 와  $\text{H}_2\text{O}_2$  등과 같은

일련의 반응기산소(reactive oxygen intermediate, ROI)가 외부 병원체에 대하여 살균 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Secombes, 1990; Shon, 1999). 본 실험에서 propolis extracts 처리구는 대조구에 비해서 식작용능이 유의성 있게 증가되었으며, NBT 환원능 또한 유의성 있게 증가 시켰다(Fig. 3, Fig. 4). 이러한 결과는 propolis extracts가 대식세포를 자극하여서 탐식작용 및 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 생성작용을 활성화시켰기 때문에 결과적으로 *S. iniae* 감염에 대한 propolis 처리구의 생존율을 높이는 것으로 판단된다. 따라서 propolis extracts 가 ROI의 활성화에 있어서 시발점이 되는 강력한 살균력을 보여주는 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 활성을 현저하게 증가시킨다는 점에서 적어도 양식넙치의 비특이적인 면역증강제로 활용될 가능성이 높을 것으로 기대된다.

특이항체매개성 면역반응은 세포내재성 병원체에 의한 감염성 질환을 방어하는 숙주 방어기작에 중요한 역할을 한다(Suzuki *et al.*, 1997). 본 실험에서 vaccine+propolis extracts 혼합 처리구는 vaccine 단독 처리구에 비하여 균체응집소가는 유의적으로 높게 나타난 결과(Fig. 5)는 마우스에 propolis extracts 를 경구적으로 단기간 처리경우에도 항체 생성의 증강효과를 보인 결과(Sforcin *et al.*, 2005)와 propolis extracts를 복강 내로 백신과 혼합 투여시 항체가 2주째부터 대조군에 비하여 매우 증가되었다는 보고(Fan *et al.*, 2010)들과 일치되어진다. 한편, 이러한 결과는 propolis extracts가 항체생성세포를 직접적으로 활성화를 유발하기 보다는 면역계 시발세포인 대식세포를 활성화에 따른 일련의 cytokine 작용으로 항체생성을 증가시켰을 것으로 추정 되나 본 실험만으로는 명확히 알 수가 없었다.

본 실험에서 propolis extracts가 균체의 감염방어력에 미치는 영향을 평가하기 위해서 *S. iniae*를 이용하여 공격실험을 한 결과 vaccine 단독구에 비해서 propolis extracts+vaccine 혼합 처리구에서 생존율이 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 6). 이러한 결과는 propolis extracts가 선천적 면역계의 활성화(lysozyme, 탐식능 및 NBT 환원능)를 유도하고 아울러 특이항체 생성 및 항체의존성 식세포 살해작

용(antibody dependent cell cytotoxicity, ADCC)등의 특이적 면역반응을 활성화 시킨 결과 어제에 감염된 *S. iniae*균에 대해서 방어능력을 현저하게 향상시켰기 때문에 사료된다. 따라서 propolis extracts는 양식넙치뿐만 아니라 타 어종에서 문제시 되는 각종 병원체의 질병 예방에도 매우 효과적일 것으로 판단되어진다.

최근 균체의 formalin 불활화 vaccine이 개발되어서 양식현장에서 질병의 예방에 널리 활용되고 있다(Nakanishi and Ototake, 1997; Ellis, 1999; Cho *et al.*, 2006; Angew and Barnes, 2007). 이들 상용 백신들의 면역지속기간을 연장하기 위한 일환으로 aluminum hydroxide, mineral oil 및 albumin등을 adjuvant로 활용하였으나 어체의 국소적인 염증 유발과 같은 부작용등으로 사용이 제한적이기 때문에 adjuvant로 이용하기 위한 생리활성물질의 탐색을 위한 다양한 노력이 시도되고 있다(Nakanishi and Ototake, 1997; Ellis, 1999). 따라서 본 실험에서 propolis extracts를 처리한 군 간의 haematocrit치의 변화율에 큰 영향을 미치지 않은 결과(Fig. 2)는 사람 및 마우스에 propolis extracts를 처리시 혈구, 혈액색소 및 기타 혈장성분에 이상을 유발시키지 않았다고 보고 등(Sforcin *et al.*, 1995., Mani *et al.*, 2006)과 일치한다. 또한 propolis extracts가 화학물질의 노출에 의해서 저하되었던 혈구성분 및 혈장성분을 정상치로 회복시키는 작용이 있었다는 보고(Cetin *et al.*, 2010)로 미루어 propolis extracts를 처리경우는 조혈장기의 대한 부작용이 거의 없는 점으로 미루어 향후 백신 adjuvant로서도 활용가능성이 높을 것으로 추정되어진다.

이상의 결과를 요약해보면 propolis extracts가 양식넙치의 혈청 중의 lysozyme, 대식세포의 식작용능 및 활성산소 환원능등을 활성화 시킨 결과로 미루어 볼때 양식 어류의 면역증강제의 유용물질로서 활용가능성이 높을 것으로 사료된다. 그렇지만 어류의 양식특성상 다양한 스트레스 환경에 처해 질 가능성이 매우 높기 때문에 따라서 양식현장에서 propolis extracts를 면역증강제로 활용하기 위해서는 면역계 주요 작동세포인 T 및 B림프구들의 미치는 영향 및 백신지속기간 등에 대한 추가 시험이 필요하리라 사료된다.



## 요 약

Propolis extracts는 다양한 성분으로 구성되어 있는 수지상의 혼합물로서 여러 약리작용을 보여주기 때문에 민간요법으로 널리 이용되어왔다. 특히 propolis extracts는 독성이 거의 없다는 장점에 면역증강제로서 활용가능성이 높게 평가되고 있다. 이에 본 실험에서는 대상으로 *in vitro* 및 *in vivo*상에서 propolis extracts가 양식넙치 면역반응에 미치는 영향을 조사하였다.

*In vitro*상에서 propolis extracts가 PBL의 탐식능 및 NBT assay활성능에 미치는 영향을 조사한 바 유효농도는 50~150 µg/ml 이었으며, 가장 활성이 높은 농도는 100µg/ml 이었다. *In vivo*상에서 양식넙치에 propolis extracts를 단독 또는 *S. iniae* 불활화 균액과 혼합하여 어체에 투여 후에 면역반응에 미치는 영향을 조사하였다. Haematocrit치는 propolis extracts단독 및 vaccine과 혼합 처리 할때 유의적 차이를 보이지 않았다. 그렇지만, 혈청 lysozyme과 신장대식세포의 탐식능, 활성산소 환원능 및 항체가는 propolis extracts+vaccine 투여구에서 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과들에 의하여 propolis extracts는 양식넙치에서 특이적 및 비특이적 면역증강작용이 우수하므로 항 후 양식어류에 있어서 비특이적 면역증강 물질 및 adjuvant로 활용가능성이 기대되어진다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년도 군산대학교 수산과학연구소 지원 연구비에 의하여 수행되어졌습니다.

## References

- Agnew W., Barnes A.C.: *Streptococcus iniae* : An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Vet. Microbiol., 122: 1-15, 2007.
- Anderson, D.P. , Moritomo, T. and de Grooth, R.: Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. Vet. Immunol. Immunopathol., 30: 419-429, 1992.
- Baeck G.W., Kim J. H., Gomez D.K. and Park S.C. : Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder(*Paralichthys olivaceus*) in Jeju island. J. Vet Sci. 7: 53-58, 2006.
- Bankova, V. : Chemical diversity of propolis the problem of standardization. J. Ethnopharmacol. 100: 114-117, 2005a.
- Bankova, V. : Recent trends and important developments in propolis research. ECAM. 2: 29-32. 2005b.
- Barton, B. B. and Iwama, G. K. : Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Ann. Rev. Fish Dis. 1: 3-26, 1991.
- Baulny, M. O., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and Gouvello, R. : Effect of long-term oral administration of β-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquat. Org., 26: 139-147, 1996.
- Burdock, G.A. : Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem. Toxicol. 36: 347-363, 1998.
- Cetin, E., Kanbur M., Silici S., Erasla G.: Propetamphos-induced changes in haematological and biochemical parameters of female rats: Protective role of propolis. Food Chem. Toxicol. 48: 1806-1810, 2010.
- Cho M. Y., Lee J. S., Lee D.C., Choi H. J., and Kim J. W. : Immune response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* against β-haemolytic *Streptococcus iniae* formalin-killed cell. J. Fish. Pathol. 19: 73-82, 2006.
- Chu W. H. : Adjuvant effect of propolis on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*), Fish & Shellfish Immunol. 21: 113-117. 2006.
- Cuesta A., Rodriguez A., Esteban M. A and Meseguer J. : *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. Fish & Shellfish Immunol. 18: 71-80, 2005.
- Dobrovolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi S. A. H. and Dandiya, P. C. : Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. J. Ethnopharmacol. 35: 77-82, 1991.
- Ellis, A. E. : Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunol., 9: 291-308, 1999.
- Fan Y., Hu Y., Wang D., Guo Z., Zhao X., Guo L.,

- Zhao B., Zhang J., Wan Y and Nguyen T.: Epimedium polysaccharide and propolis flavone can synergistically stimulate lymphocyte proliferation in vitro and enhance the immune responses to ND vaccine in chickens, *Int. J. Biol. Macromol.* 47: 87-92, 2010.
- Fletcher, T. C. and White, A. : The lysozyme of the plaice *pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55: 207-210, 1996.
- Havsteen, B. : Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology.* 32: 1141-1148, 1983.
- Heo, G. J., Shin K. S. and Lee. M. H. : Diseases of aquaculture animals and prevention of drug residues. *Kor. J. Food Hygiene*, 7: S1-S19. 1992.
- Ingram, G. A. : Substances involved in the natural resistance of fish to infection a review. *J. Fish Biol.*, 16: 23-60, 1992.
- Iwama, G., Pickering, A. D., Sumpster, J. P. and Schreck, C. B.: *Fish stress and health in aquaculture.* Cambridge University Press, 125-156, 1997.
- Jia, J. and Wu, Z : Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudomoscianea crocea*(Richardson). *Aquaculture* 218: 1-9, 2003.
- Kim H. J., Woo S. H., Kim J. W. and Park S.I. : Morphological characteristics and pathogenesis of *Streptococcus iniae*. *J. Fish Pathol.*, 18: 167-178, 2005.
- Kim, J. W., Lee C. H., and Kim E. H. : Transferable R plasmid of *streptococci* sp. isolated from diseased olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) in Jeju. *J. Fish Pathol.*, 19: 267-276, 2006.
- Kim, J. W., Park, S. I. and Chun, S. K. : Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 5: 87-92, 1992.
- Kim, K. H., Hwang, Y. J. and Bai, S. C. : In vitro effect of aloe on the respiratory burst activity of olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) leucocytes. *J. Fish Pathol.*, 12: 1-6, 1999.
- Kim M. S., Seo. J. S., Park., M. A., Cho., J. M., Hwang., J. Y., Kwon., M. G., Jung., S. H.: Antimicrobial resistance of *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp. isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish. Pathol.* 23: 37-45, 2010.
- Nakanishi, T. and Ototake, M. : Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In *Fish Vaccinology*, (ed. Cudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J. and Brown, F.), pp. 59-68, Karger Press, 1997.
- Niki, L., T. P. T. Evelyn and L. J. Albright : Trials with an orally and immersion-administered *Beta-1,3-glucan* as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.*, 17: 191-196. 1993.
- Roberson, B. S. : Bacterial agglutination. In *techniques in fish immunology*(eds. Stolen J. S., Flecher, G. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S. and van Muiswinkle W. B) pp. 137-154, Fair Haven(NJ): SOS publication; 1990.
- Sakai, M.: Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63-92, 1999.
- Secombes, C. J. : Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In *Techniques in fish immunology.* (eds. Stolen J.S, Flecher G.C., anderson D.P., Roberson B.S. and van Muiswinkle W.B), pp. 137-154. Fair Haven (NJ): SOS publication, 1990,
- Secombes, C. J.: The nonspecific immune system: Cellular defences In: *The fish immune system: Organism, pathogens, environment* (eds . Iwama, G. and Nakanish, T.): pp.63-103, Academic Press, USA. 1996.
- Sforcin, J. M., Oris, R. O. and Bankova, V. : Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J. Ethnopharmacol.* 98: 301-305, 2005.
- Shon, Y. C. : Effects of medical herb stuff extracts and mitogens on the activation of kidney macrophage in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Master Thesis, Pukyung National University, Korea, p63, 1999.
- Siwicki, A and Studnicka, M., : The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, 31(Suppl A): 57-60, 1987.
- Stahl, P. D. : The mannose receptor and other macrophages lectins. *Cur. Opin. Immunol.*, 4: 49-52, 1992.
- Suzuki, Y., Otaka, T., Sato, S., Hou, Y. and Aida, K. : Reproduction related immunoglobulin changes in rainbow trout. *Fish. Physiol. Biochem.*, 17 : 415-421, 1997.
- Takahashi, Y., Itami, T. and Konegawa, K. : Enzymatic properties of partially lysozyme from the skin mucus of carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52: 1209-1214, 1986.

---

Manuscript Received : February 11, 2014

Revised : March 31, 2014

Accepted : April 09, 2014