

부동화 스트레스 유도 마우스 모델에서 刀豆, 牛蒡根 복합물의 면역증진 작용

이지은^{1#}, 노성수³, 김한영², 김근희², 김승형^{1*}

1 : 대전대학교 동서생명과학연구원, 2 : 애경중앙연구소, 3 : 대구한의대학교 한의과대학

대한본초학회 편집위원회에서는 제32권 1호(2017년 1월) Kor. J. Herbol, 2017 : 32(1) : 1-13 [부동화 스트레스 유도 마우스 모델에서 刀豆, 牛蒡根 복합물의 면역증진 작용](이지은^{1#}, 노성수³, 김한영², 김근희², 김승형^{1*}) 논문 중 4페이지와 8페이지에서의 기입 표기오류, 12페이지의 사사누락으로 인한 저자들의 요구에 의하여 수정 공지 합니다.

〈3페이지 수정전〉

7. 부검

실험 종료 후 실험동물은 Ethyl ether으로 마취시킨 후 50 I.U heparin(APU8AF, 중외제약) 20 μ l을 처리한 3 ml 주사기(BD EmeraldTM, USA)를 이용하여 심장 천자법으로 채혈하여 800 ~ 1000 μ l 혈액을 획득하고, 면역기관 세포(Thymus, Spleen, LN, MLN)들을 분리하였다.

〈3페이지 수정후〉

7. 부검

실험 종료 후 실험동물은 Ethyl ether으로 마취시킨 후 50 I.U heparin(APU8AF, 중외제약) 20 μ l을 처리한 3 ml 주사기(BD EmeraldTM, USA)를 이용하여 심장 천자법으로 채혈하여 800 ~ 1000 μ l 혈액을 획득하고, 면역기관 세포(Thymus, Spleen, DLN, MLN)들을 분리하였다.

〈4페이지 수정전〉

Ⅲ. 결 과

1. 刀豆, 牛蒡根 복합물의 HPLC 분석

刀豆, 牛蒡根 복합물(CG+AL) 중 지표성분 Chlorogenic acid과 Chicoric acid의 함량분석을 위해 이들 표준품은 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml의 농도로 제조하고, CG+AL복합물의 농도는 20 mg/ml로 하여 HPLC 분석을 시행한 후 표준품의 양과 peak area사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하여 계산하였다(Table. 2). HPLC-PDA를 이용하여 刀豆 유래 Chlorogenic acid와 牛蒡根 유래 Chicoric acid에 대한 동시분석조건을 설정하여 함량을 분석하였다. 검량선의 상관관계(r^2)는 0.99 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 1). 분석결과 Chlorogenic acid과 Chicoric acid의 피크는 각각 12.385와 26.083 min에서 나타났으며 함량은 각각 15.252와 6.06 mg/g으로 나타났다.

2. 부동화 마우스의 체중 및 장기 무게 변화

Table. 3은 체중증가량과 장기 무게를 나타낸 것으로 부동화 대조군(Immobilization- stress control, IM_S-CTL)은 정상군(C57BL/6J_Nr)에 비하여 체중 감소가 나타났고, 刀豆 70% 주정 추출물(CG70%E, 이하 刀豆 추출물) 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk), 牛蒡根 70% 주정 추출물(AL70%E, 이하 牛蒡根 추출물) 100 mg/kg 투여군(IM_S-AL70%E_100mpk), 그리고 刀豆 70% 주정 추출물과 牛蒡根 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 복합물(CG+AL (1:4), 이하 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물) 100mg/kg 투여군(IM_S- CG+AL(1:4)_100mpk)에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 체중감소가 **적게 나타났다(Table. 3)**. 장기무게를 측정한 결과는 Table. 2에 나타내었으며 장기의 무게(mg)/체중(g)의 비율로 나타내었다. 심장의 무게는 정상군이 5.05 ± 0.31 mg/g body weight인 데 비해 대조군에서는 5.60 ± 0.34 mg/g body weigh로 다소 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 실험군에서는 刀豆 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70% E_100mpk)을 제외한 나머지 투여군에서 정상군보다 낮은 수치를 나타내었으나 통계적인 유의차는 없었다. 비장의 무게는 정상군이 4.17 ± 0.31 mg/g body weight이며 부동화 대조군에서는 4.62 ± 2.41 mg/g body weigh로 다소 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 모든 실험군에서 비장의 무게는 정상군과 부동화 대조군에 비하여 낮은 수치를 나타내었으나 통계적인 유의차는 없었다. 흉선의 무게는 정상군이 2.85 ± 0.31 mg/g body weight이며 대조군에서는 2.92 ± 0 mg/g body weigh로 다소 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 실험군에서는 刀豆 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL (1:4)_100mpk)에서 정상군과 부동화 대조군에 비하여 낮은 수치를 나타내었으나 통계적인 유의차는 없었다. 그러나 이러한 무게의 변화는 단순히 평균값을 비교하였을 경우에만 한정되며, 모든 장기에서 刀豆와 牛蒡根 추출물의 투여에 따른 무게의 변화의 통계적인 유의차는 없었다.

〈4페이지 수정후〉

Ⅲ. 결 과

1. 刀豆, 牛蒡根 복합물의 HPLC 분석

刀豆, 牛蒡根 복합물(CG+AL) 중 지표성분 Chlorogenic acid과 Chicoric acid의 함량분석을 위해 이들 표준품은 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 제조하고, CG+AL복합물의 농도는 20 mg/ml로 하여 HPLC 분석을 시행한 후 표준품의 양과 peak area사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하여 계산하였다(Table. 2). HPLC-PDA를 이용하여 刀豆 유래 Chlorogenic acid와 牛蒡根 유래 Chicoric acid에 대한 동시분석조건을 설정하여 함량을 분석하였다. 검량선의 상관관계(r^2)는 0.99 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. **분석결과** Chlorogenic acid과 Chicoric acid의 피크는 각각 **12,285와 25,979 min**에서 나타났으며 함량은 각각 15,252와 6.06 mg/g으로 나타났다.

2. 부동화 마우스의 체중 및 장기 무게 변화

Table. 3은 체중증가량과 장기 무게를 나타낸 것으로 부동화 대조군(Immobilization- stress control, IM_S-CTL)은 정상군(C57BL/6J_Nr)에 비하여 체중 감소가 나타났고, 刀豆 70% 주정 추출물(CG70%E, 이하 刀豆 추출물) 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk), 牛蒡根 70% 주정 추출물(AL70%E, 이하 牛蒡根 추출물) 100 mg/kg 투여군(IM_S-AL70%E_100mpk), 그리고 刀豆 70% 주정 추출물과 牛蒡根 70% 주정 추출물의 1:4의 비율로 혼합한 복합물(CG+AL (1:4), 이하 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물) 100mg/kg 투여군(IM_S- CG+AL(1:4)_100mpk)에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 체중감소가 **억제되었다 (Table. 3)**. 장기무게를 측정한 결과는 Table. 3에 나타내었으며 장기의 무게(mg)/체중(g)의 비율로 나타내었다. 심장의 무게는 정상군이 5.05 ± 0.31 mg/g body weight인 데 비해 대조군에서는 5.60 ± 0.34 mg/g body weigh로 다소 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 실험군에서는 刀豆 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70% E_100mpk)을 제외한 나머지 투여군에서 정상군보다 낮은 수치를 나타내었으나 통계적인 유의차는 없었다. 비장의 무게는 정상군이 4.17 ± 0.31 mg/g body weight이며 부동화 대조군에서는 4.62 ± 2.41 mg/g body weigh로 다소 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 모든 실험군에서 비장의 무게는 정상군과 부동화 대조군에 비하여 낮은 수치를 나타내었으나 통계적인 유의차는 없었다. 흉선의 무게는 정상군이 2.85 ± 0.31 mg/g body weight이며 대조군에서는 2.92 ± 0 mg/g body weigh로 다소 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 실험군에서는 刀豆 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL (1:4)_100mpk)에서 정상군과 부동화 대조군에 비하여 낮은 수치를 나타내었으나 통계적인 유의차는 없었다. 그러나 이러한 무게의 변화는 단순히 평균값을 비교하였을 경우에만 한정되며, 모든 장기에서 刀豆와 牛蒡根 추출물의 투여에 따른 무게의 변화의 통계적인 유의차는 없었다.

〈6페이지 수정전〉

3. 혈청에서 Cortisol, serotonin 생성량

Fig.2-A는 혈청 중 Cortisol 수준을 측정한 결과로, 刀豆 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk, $p < 0.05$) 그리고 牛蒡根 추출물 50 mg/kg 투여군(IM_S-AL70% E_100mpk, $p < 0.05$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk, $p < 0.01$)에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 Cortisol 수준이 감소를 나타냈다(Fig. 2). Fig.2-B는 혈청 중 Serotonin 수준을 측정한 결과로, 刀豆 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk, $p < 0.05$), 牛蒡根 추출물 50 mg/kg 투여군(IM_S-AL70%E_100mpk, $p < 0.05$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL (1:4)_100mpk, $p < 0.01$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 50 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk, $p < 0.01$)에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 Serotonin 수준이 증가를 나타냈다(Fig. 2).

〈6페이지 수정후〉

3. 혈청에서 Cortisol, serotonin 생성량

Fig.2-A는 혈청 중 Cortisol 수준을 측정한 결과로, 刀豆 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk, $p < 0.05$) 그리고 牛蒡根 추출물 50 mg/kg 투여군(IM_S-AL70% E_50mpk, $p < 0.05$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk, $p < 0.01$)에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 Cortisol 수준이 감소를 나타냈다(Fig. 2). Fig.2-B는 혈청 중 Serotonin 수준을 측정한 결과로, 刀豆 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk, $p < 0.05$), 牛蒡根 추출물 50 mg/kg 투여군(IM_S-AL70%E_50mpk, $p < 0.05$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL (1:4)_100mpk, $p < 0.01$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 50 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk, $p < 0.01$)에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 Serotonin 수준이 증가를 나타냈다(Fig. 2).

〈8페이지 수정전〉

7. 면역기관(DLN, MLN, Spleen, thymus) FACS 분석

1) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 DLN (Draining lymph node) 세포에서 면역세포의 활성 및 수 변화 DLN에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 CD4(CD4 T cell marker) CD8(CD8 T cell marker)이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 모두 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4, CD8이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Table. 3). 또한 DLN에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 활성화된 CD4⁺/CD69⁺가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 모두 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 활성화된 CD4⁺/CD69⁺가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 CD4⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 3). DLN에서 활성화된 CD8⁺/CD69⁺는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 모두 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 활성화된 CD8⁺/CD69⁺가 증가 되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 CD8⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 4). DLN에서 활성화된 NK1.1⁺/CD69⁺는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 모두 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 활성화된 NK1.1⁺/CD69⁺가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 NK1.1⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 3). DLN에서 B세포 활성은 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 B세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 B세포 활성이 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 4).

2) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 MLN (Mesenteric lymph nodes) 세포에서 면역세포의 활성화 및 수 변화

MLN에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 CD4 T세포 활성이 감소하며 CD8 T세포 활성이 증가 되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4 T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Table. 5). MLN에서 CD4⁺/CD69⁺ Th세포 활성은 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 100 mg/kg(IM_S-CG70% E_100mpk), 牛蒡根 100 mg/kg(IM_S-AL70%E_100mpk), 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 25 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk)을 제외한 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4⁺/CD69⁺ Th세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 CD4⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 5). MLN에서 CD8⁺/CD69⁺ Th세포 활성은 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물 100 mg/kg(IM_S-CG_100mpk)를 제외한 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD8⁺/CD69⁺ Th세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 CD8⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 5). MLN에서 NK1.1⁺/CD69⁺ 세포 활성은 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 차이가 없었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서도 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 NK1.1⁺/CD69⁺ Th 세포 활성에서 큰 차이를 볼 수 없었다(Table. 5).

〈8페이지 수정후〉

7. 면역기관(DLN, MLN, Spleen, thymus) FACS 분석

1) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 DLN (Draining lymph node) 세포에서 면역세포의 활성화 및 수 변화

DLN에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 CD4(CD4 T cell marker) CD8(CD8 T cell marker)이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 모두 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4, CD8이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Table. 4). 또한 DLN에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 활성화된 CD4⁺/CD69⁺가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 모두 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 활성화된 CD4⁺/CD69⁺가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 CD4⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 4). DLN에서 활성화된 CD8⁺/CD69⁺는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 모두 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 활성화된 CD8⁺/CD69⁺가 증가 되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 CD8⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 4). DLN에서 활성화된 NK1.1⁺/CD69⁺는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 약간 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 모두 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 활성화된 NK1.1⁺/CD69⁺가 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 NK1.1⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 4). DLN에서 B세포 활성은 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 B세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 B세포 활성이 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 4).

2) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 MLN (Mesenteric lymph nodes) 세포에서 면역세포의 활성화 및 수 변화

MLN에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 CD4 T세포 활성이 감소하며 CD8 T세포 활성이 증가 되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 25 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk)에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4 T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Table. 5). MLN에서 CD4⁺/CD69⁺ Th세포 활성은 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆 100 mg/kg(IM_S-CG70% E_100mpk), 牛蒡根 100 mg/kg(IM_S-AL70%E_100mpk), 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 25 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk)을 제외한 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4⁺/CD69⁺ Th세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 25 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk)에서 가장 활성화된 CD4⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 5). MLN에서 CD8⁺/CD69⁺ Th세포 활성은 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을

확인할 수 있었고, 刀豆 추출물 100 mg/kg(IM_S-CG_100mpk)를 제외한 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD8⁺/CD69⁺ Th세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 25 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk)에서 가장 활성화된 CD8⁺/CD69⁺가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 5). MLN에서 NK1.1⁺/CD69⁺ 세포 활성은 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 차이가 없었고, 刀豆 추출물, 牛蒡根 추출물, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서도 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 NK1.1⁺/CD69⁺ Th 세포 활성에서 큰 차이를 볼 수 없었다(Table. 5).

〈9페이지 수정전〉

3) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 비장세포에서 면역세포의 활성 및 수 변화

비장(spleen)에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 CD4⁺ & CD8⁺ T 활성 세포 수가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 모든 투여군에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4⁺ & CD8⁺ T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 CD8⁺가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 6). 비장에서 CD4⁺/CD69⁺ T 활성 세포 수는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 차이를 볼 수 없었지만, 牛蒡根 추출물 100 mg/kg와 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 25 mg/kg 투여군을 제외한 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4⁺/CD69⁺ T세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Table. 6). 비장에서 CD8⁺/CD69⁺ T 활성 세포 수는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 모든 투여군에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD8⁺/CD69⁺ T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군에서 CD8⁺/CD69⁺ 활성 세포수가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 6). 비장에서 NK1.1과 NK1.1⁺/CD69⁺ NK 활성 세포 수는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 **농도 의존적으로 NK1.1과 NK1.1⁺/CD69⁺ NK세포 활성이** 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군에서 NK1.1과 NK1.1⁺/CD69⁺ NK활성 세포수가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 6). 비장에서 CD11b⁺/CD69⁺ 활성 세포수는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 **농도 의존적으로 CD11b⁺/CD69⁺ 세포 활성이** 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군에서 CD11b⁺/CD69⁺ 활성 세포 수가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table 6).

〈9페이지 수정후〉

3) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 비장세포에서 면역세포의 활성 및 수 변화

비장(spleen)에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 CD4⁺ & CD8⁺ T 활성 세포 수가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 모든 투여군에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4⁺ & CD8⁺ T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 CD8⁺가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 6). 비장에서 CD4⁺/CD69⁺ T 활성 세포 수는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 차이를 볼 수 없었지만, 牛蒡根 추출물 100 mg/kg와 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 25 mg/kg 투여군을 제외한 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD4⁺/CD69⁺ T세포 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Table. 6). 비장에서 CD8⁺/CD69⁺ T 활성 세포 수는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 모든 투여군에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 CD8⁺/CD69⁺ T세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군에서 CD8⁺/CD69⁺ 활성 세포수가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 6). 비장에서 NK1.1과 NK1.1⁺/CD69⁺ NK 활성 세포 수는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 **NK1.1과 NK1.1⁺/CD69⁺ 활성 세포수가** 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군에서 NK1.1과 NK1.1⁺/CD69⁺ 활성 세포수가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 6). 비장에서 CD11b⁺/CD69⁺ 활성 세포수는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 나머지 투여군에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 **CD11b⁺/CD69⁺ 활성 세포수가** 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군에서 CD11b⁺/CD69⁺ 활성 세포수가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table 6).

〈11~12페이지 수정전〉

IV. 고 찰

본 연구는 아직 광범위하게 다루어지지 않은 식물 유래 추출물의 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하며, 식물 유래 추출물들을 혼합하였을 때 상승효과로 나타나는 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하기 위해 시행되었다. *刀豆(Canavalia gladiata)*는 항염증 및 항산화 작용 등에 효능이 있다고 이미 보고된 바가 있다^{14,15)}. *牛蒡根* 또한 항염증, 항산화 및 항바이러스와 같은 효과를 지니며 다양하게 임상적으로 사용할 수 있다고 보고되었고^{17,18)}, 면역조절에 대한 연구로는 Th1/Th2 불균형을 조절하고 전염증성 cytokines 및 chemokines을 억제하는 효능이 있는 것으로 보고되었으며¹⁹⁾, *刀豆*의 lectins 성분은 면역 감작된 rat에 대한 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었으나²⁰⁾, 아직까지 면역조절에 관한 연구는 부족한 상황이다.

따라서 본 연구에서는 식물 유래 추출물인 *刀豆*와 *牛蒡根* 추출물의 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하며, *刀豆* 추출물과 *牛蒡根* 추출물을 혼합하였을 때 나타나는 스트레스 매개 면역조절 상승효과를 in vivo에서 확인해보았다. 최근 Anna Jung 등에 의해 부동화 스트레스를 유도한 동물모델에서 혈장 내 Cortisol 수치가 높으며, 스트레스 완화 모델에서는 Cortisol 수치가 감소한다고 보고하였는데²²⁾, 본 연구에서도 부동화 스트레스를 유도한 마우스모델에서 혈장 내 Cortisol 수치가 증가하였으며 *刀豆* 추출물 단독투여보다는 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물을 투여하였을 때 Cortisol 수치는 더욱 감소됨을 확인할 수 있었다. 반면 serotonin의 생성량은 부동화 스트레스를 유도한 마우스모델에서 감소하였으며, *刀豆* 추출물 단독투여보다는 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물을 투여하였을 때 serotonin의 생성량이 더욱 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 *刀豆* 추출물 단독투여보다 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물 투여에 의한 스트레스 완화 효과를 확인할 수 있었다. *刀豆*와 *牛蒡根*의 면역 조절에 관한 선행 연구결과는 확인할 수 없었지만, 이번 실험을 통해 부동화 스트레스 마우스모델에 *刀豆* 및 *牛蒡根* 추출물을 경구투여한 후 변화하는 면역 관련 지표들을 확인해 보았다. 그 결과, *刀豆* 추출물을 단독으로 경구투여한 마우스 그룹보다 *刀豆*와 *牛蒡根* 1:4 복합물을 투여한 마우스 그룹에서 T/B cell 및 macrophage, NK cell 등 면역세포의 수와 활성 및 IgA 생성량이 더욱 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 *刀豆* 추출물 단독투여보다 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물 투여에 의해 면역증진 효과가 다소 증진되는 것을 확인하였다. 또한 뇌 조직 면역형광염색 결과에서도 *刀豆*와 *牛蒡根*을 각각 투여했을 때 보다 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물 투여군에서 뇌의 기억력증진과 스트레스 호르몬을 억제하는 것으로 알려진 BDNF 발현이 현저하게 증가된 것으로 보아 *刀豆*와 *牛蒡根*의 복합물에 의한 상승효과를 알 수 있었다. 그리고 최근 Jeon YJ의 연구에서는 세포주에서 *刀豆*를 포함한 식욕에서 IL-1beta와 TNF- α 생성량을 감소시킨다고 보고했는데²³⁾, 본 연구에서도 *刀豆* 추출물이 염증성 사이토카인인 IL-1beta, IL-6, TNF- α 를 감소시키는 것으로 보아 *刀豆* 추출물이 염증반응을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히, *刀豆* 추출물 단독 투여군 보다는 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물 100mpk 투여군에서 염증사이토카인(IL-1beta, IL-6, TNF- α) mRNA 유전자 발현이 현저하게 감소시키는 것으로 보아 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물 투여군에서 염증반응이 가장 낮은 것을 관찰하였다. 또한 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군에서 면역 T세포 활성 사이토카인(IL-2, IL-10, IFN- γ , IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, *刀豆* 추출물 단독으로 경구투여한 마우스 그룹보다 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물 투여 마우스 그룹에서 면역 활성이 증가 하는 것을 볼 수 있었다. 그러므로 위 결과들에 비추어 보았을 때 *刀豆* 추출물이나 *牛蒡根* 추출물을 단독으로 투여 하였을 때보다는 *刀豆*, *牛蒡根* 복합물을 투여 하였을 때 면역증진효과가 클 것으로 사료된다. 따라서 질병의 치료보다는 예방 개념으로 건강 기능성 식품을 제작할 때, *刀豆*와 *牛蒡根*의 복합물이 건강기능성 식품 개발에 좋은 원료가 될 것이라고 사료된다.

〈11~12페이지 수정후〉

IV. 고 찰

본 연구는 아직 광범위하게 다루어지지 않은 식물 유래 추출물의 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하며, 식물 유래 추출물들을 혼합하였을 때 상승효과로 나타나는 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하기 위해 시행되었다. *刀豆(Canavalia gladiata)*는 항염증 및 항산화 작용 등에 효능이 있다고 이미 보고된 바가 있다^{14,15)}. *牛蒡根* 또한 항염증, 항산화 및 항바이러스와 같은 효과를 지니며 다양하게 임상적으로 사용할 수 있다고 보고되었고^{17,18)}, 면역조절에 대한 연구로는 Th1/Th2 불균형을 조절하고 전염증성 cytokines 및 chemokines을 억제하는 효능이 있는 것으로 보고되었으며¹⁹⁾, *刀豆*의 lectins 성분은 면역 감작된 rat에 대한 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었으나²⁰⁾, 아직까지 면역조절에 관한 연구는 부족한 상황이다.

따라서 본 연구에서는 식물 유래 추출물인 *刀豆*와 *牛蒡根* 추출물의 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하며, *刀豆* 추출물과 *牛蒡根* 추출물을 혼합하였을 때 나타나는 스트레스 매개 면역조절 상승효과를 in vivo에서 확인해보았다. 최근 Anna Jung 등에 의해 부동화 스트레스를 유도한 동물모델에서 혈장 내 Cortisol 수치가 높으며, 스트레스 완화 모델에서는 Cortisol 수치가 감소한다고 보고하였는데^{22,23)}, 본 연구에서도 부동화 스트레스를 유도한 마우스모델에서 혈장 내 Cortisol 수치가 증가하였으며 *刀豆* 추출물 단독투여보다는 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물을 투여하였을 때 Cortisol 수치는 더욱 감소됨을 확인할 수 있었다. 반면 serotonin의 생성량은 부동화 스트레스를 유도한 마우스모델에서 감소하였으며, *刀豆* 추출물 단독투여보다는 *刀豆*, *牛蒡根* 1:4 복합물을 투여하였을 때 serotonin의 생성량이 더욱 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 *刀豆* 추출물 단독투여보다 *刀豆*, *牛蒡根*

1:4 복합물 투여에 의한 스트레스 완화 효과를 확인할 수 있었다. 刀豆와 牛蒡根의 면역 조절에 관한 선행 연구결과는 확인할 수 없었지만, 이번 실험을 통해 부동화 스트레스 마우스모델에 刀豆 및 牛蒡根 추출물을 경구투여한 후 변화하는 면역 관련 지표들을 확인해 보았다. 그 결과, 刀豆 추출물을 단독으로 경구투여한 마우스 그룹보다 刀豆와 牛蒡根 1:4 복합물을 투여한 마우스 그룹에서 T/B cell 및 macrophage, NK cell 등 면역세포의 수와 활성 및 IgA 생성량이 더욱 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 刀豆 추출물 단독투여보다 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여에 의해 면역증진 효과가 다소 증진되는 것을 확인하였다. 또한 뇌 조직 면역 형광염색 결과에서도 刀豆와 牛蒡根을 각각 투여했을 때 보다 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서 뇌의 기억력증진과 스트레스 호르몬을 억제하는 것으로 알려진 BDNF 발현이 현저하게 증가된 것으로 보아 刀豆와 牛蒡根의 복합물에 의한 상승효과를 알 수 있었다. 그리고 최근 Jeon YJ의 연구에서는 세포주에서 刀豆를 포함한 식품에서 IL-1beta와 TNF- α 생성량을 감소시킨다고 보고했는데²³⁾, 본 연구에서도 刀豆 추출물이 염증성 사이토카인인 IL-1beta, IL-6, TNF- α 를 감소시키는 것으로 보아 刀豆 추출물이 염증반응을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 刀豆 추출물 단독 투여군 보다는 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100mpk 투여군에서 염증사이토카인(IL-1beta, IL-6, TNF- α) mRNA 유전자 발현이 현저하게 감소시키는 것으로 보아 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여군에서 염증반응이 가장 낮은 것을 관찰하였다. 또한 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 mg/kg 투여군에서 면역 T세포 활성 사이토카인(IL-2, IL-10, IFN-gamma, IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 刀豆 추출물 단독으로 경구투여한 마우스 그룹보다 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여 마우스 그룹에서 면역 활성이 증가 하는 것을 볼 수 있었다. 그러므로 위 결과들에 비추어 보았을 때 刀豆 추출물이나 牛蒡根 추출물을 단독으로 투여 하였을 때보다는 刀豆, 牛蒡根 복합물을 투여 하였을 때 면역증진효과가 클 것으로 사료된다. 따라서 질병의 치료보다는 예방 개념으로 건강 기능성 식품을 제작할 때, 刀豆와 牛蒡根의 복합물이 건강기능성 식품 개발에 좋은 원료가 될 것이라고 사료된다.

〈수정 및 추가〉

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업 (과제번호: 15036-03)의 연구비 지원으로 이루어진 결과의 일부로 이에 감사드립니다.