

Cyclophosphamide에 의한 면역저하 동물모델에서 블루베리 효모 발효 분말의 면역증강 효과

정도연 · 양희중 · 정수지 · 김민국¹ · 윤지영¹ · 이학용² · 이양희² · 신동엽² · 양예진² · 이해성² · 박영미^{2*}

(재)발효미생물산업진흥원, 1: 예수병원 부설 기독교학연구원, 2: 주식회사 인비보

Immunostimulatory Effects of Blueberry Yeast Fermented Powder Against Cyclophosphamide-induced Immunosuppressed Model

Do Youn Jeong, Hee Jong Yang, Su Ji Jeong, Min Guk Kim¹, Chi Young Yun¹, Hak Yong Lee², Yang Hee Lee², Dong Yeop Shin², Yea gin Yang², Hae Seong Lee², Young Mi Park^{2*}

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), 1: Christian Medical Research Center, Presbyterian Medical Center, 2: INVIVO Co. Ltd.

Current studies have been reported that fruits such as berries may contain both antioxidant and antitumor polyphenols that may be important in this regard. We investigated the immunostimulatory effect of fermented blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) on cyclophosphamide-induced immunosuppression in animal model. Rats were administered blueberry yeast fermented powder (BYFP) at doses 30, 100, and 300 mg/kg for 4 weeks after cyclophosphamide (Cy) treatment, respectively. The immunomodulatory effect of BYFP were measured both in vitro and in vivo, and the changes of blood components were also analyzed. We found that BYFP recovered immunosuppression-mediated decreased liver, spleen, and thymus weights as well as up regulation of white blood cell, lymphocyte, and neutrophil in blood. Moreover, BYFP up-regulated IL-2, TNF- α , and IFN- γ pro-inflammatory cytokine production compared to immune suppressed control group, respectively. According to histological studies, BYFP regenerated significantly on Cy-mediated injured spleen at the high doses (BYFP 300) comparison with Cy-treated groups (immunosuppression). Collectively, these findings suggest that BYFP may have the potential as a dietary immunostimulatory agent.

keywords : Blueberry, Immunomodulatory effect, Cyclophosphamide, Cytokines, Dietary immunostimulator

서 론

한의학에서 <素問>에 “正氣存內 邪不可干 邪氣所湊 其氣必虛”이라 하였듯이 면역력은 “正氣”로, 병원체는 “邪氣”로 칭하고 이 두 존재 유무로 발병을 진단하였던 기록으로 비추어 볼 때, 서양의 현대의학의 면역개념과 유사하다고 할 수 있다¹⁾. 면역 체계는 인체에 유해한 다양한 외부물질과 병원체, 감염원 등으로부터 인체를 보호하는 방어기전으로 발병을 막고 진전시키는 역할을 하며, 면역계는 증진(immunostimulation)과 억제(immunosuppression)작용으로 항상성을 유지하여 면역을 조절하게 된다²⁾.

면역억제제와 항암치료제로 임상에서 일반적으로 사용되는 알킬레이션 유도제 중 하나인 Cyclophosphamide (Cy)는 류마티스 관절염 및 다발성 골수종, 림프종, 백혈병과 같은 혈액종양과 골수

이식을 위한 환자의 화학적 면역 치료시 사용되고 있다^{3,4)}. 그러나 Cy 처리 후 체중 감소, 간 기능 장애, 골수부전에 의한 혈소판 감소증, 빈혈 등의 생리기능에 대한 부작용이 발생할 수 있음이 알려져 있다. 최근 이렇게 항암 치료에 사용되는 의약품들에 의해 유발되는 체내면역 환경의 변화를 경감시킬 수 있는 생리활성물질 중 특히, 과일과 채소류의 섭취를 통해 개선효과를 확인한 연구들이 다수 보고되고 있다⁵⁻⁷⁾.

그 중 장과류(漿果類: 블루베리, 크랜베리, 딸기류 등)에 다량 함유되어 있는 폴리페놀(polyphenol) 중 특히 안토시아닌(anthocyanin)의 체내 보호효과에 대해 관심을 갖고 연구가 진행 중이다. 장과류 연구에 대한 관심이 높아진 이유는 대부분의 장과류(특히 블루베리)가 풍부하게 함유하고 있는 폴리페놀의 항산화효과가 암, 심혈관계, 신경계질환과 같은 산화적인 스트레스와 연관

* Corresponding author

Young Mi Park, 310, GVSC, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea

E-mail : pym07130@daum.net ·Tel : +82-63-857-1254

Received : 2018/10/02 ·Revised : 2018/12/14 ·Accepted : 2019/01/17

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.02.33.1.48>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

된 다양한 질병을 예방하는 주요 인자라는 것을 인지하였기 때문이다⁸⁾. 델피니딘(delphinidin), 말비딘(malvidin), 페투니딘(petunidin), 시아니딘(cyanidin) 그리고 페오니딘(peonidin) 등의 안토시아닌(ACNs)은 항산화작용을 하는 것으로 알려져 있는데 종양억제, 지질 감소, 체중 조절, 혈당 및 혈압 조절, 만성염증 질환 완화 등의 효과도 있음이 밝혀졌다⁹⁻¹²⁾. 그러나 천연물을 이용한 연구는 식물 자체에서 존재하는 폴리페놀, 안토시아닌, 플라보노이드 등의 저분자 화합물을 대상으로 효과검증을 했기 때문에 다양한 섭취형태에 따른 효과의 변화에 대한 연구는 진행된 바가 없다¹³⁾.

근래에 들어, 천연물유래 생리활성기능성 식품 및 의약품은 합성약품보다 독성이 낮고 인체에 미치는 유해한 부작용이 적으며¹⁴⁾, 염증 완화와 조직재생¹⁵⁾, 주요 암의 재발 방지효과에 대해 보고되었다¹⁶⁾. 또한 천연물 유래 다당체가 면역세포 및 cytokine의 분비를 촉진하여 체내 면역계를 활성화시킨다고 알려져 있어¹⁷⁾ 다양한 식물 유래물질의 면역조절제로서의 가능성을 확인하는 연구가 진행되고 있다¹⁸⁻²¹⁾.

본 연구에서는 생육이 아닌 효모 발효공정 후 건조한 블루베리 분말을 이용하여 면역억제제인 Cyclophosphamide (Cy) 처리에 의한 면역억제 동물모델에 투여 후 비장세포의 cytokine 생산, 혈액내 세포구성 변화, 조직학적 분석을 통하여 블루베리 효모 발효 분말이 면역 조절효과에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 공시료 제조

블루베리는 전라북도 순창군에서 재배 및 수확한 블루베리 (*Vaccinium corymbosum* L.)를 구입하여 사용하였으며, 블루베리 발효를 위한 균주는 (재)발효미생물산업진흥원에서 보유하고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* SRCM100936 (KCCM12244P)를 사용하였다. 블루베리를 발효하기 위한 종균은 YPD broth (Difco™, MI, USA)에 SRCM100936을 접종하여 30°C, 150 rpm에서 2일간 배양한 후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 회수한 균체를 멸균수로 3회 세척하여 발효를 위한 스타터로 사용하였다. 블루베리 효모 발효 분말 제조를 위하여 블루베리 과실을 파쇄한 후 85°C에서 45분간 저온 살균하고 앞서 준비한 종균 스타터 (1.0×10^8 CFU/ml, OD600 4.0) 10%를 접종하여 25°C에서 4일간 정치하여 발효하고, 발효물을 건조하여 블루베리 효모 발효 분말 (BYFP)을 제조하였다.

2. 실험동물

실험동물은 샘타코 바이오코리아(오산 한국)에서 Specific-pathogen free (SPF) 상태의 Wistar rat 5주령을 분양받아 실험에 사용하였다. 사육기간 중 식이는 일반 고품사료(Samtako, Gyunggi, Korea)를 급여하며 순화기간 중 음수는 필터링 된 음용수를 매일 갈아주며 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사육기간 중 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 소음 60 phone이하, 조명시간 08:00-20:00 (1일 12시간), 조도 150-300 Lux, 환기는 시간당 10회-12회의 환경을 유지하였다. 본 실험은 원광대학교의 동물실험윤리규정을 준수

하여 수행하였다(승인번호 WKU17-114).

3. 면역 저하 유도 모델

면역 저하물질로 알려진 cyclophosphamide (Cy)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 선행 연구 결과 시험 진행에 있어 가장 적합한 Cy 투여 농도로 확인된 5 mg/kg를 투여농도로 설정하여 본 실험을 진행하였다. 본 시험에서 면역 저하물질인 Cy는 시험물질과 동시에 투여하였으며, 투여 방법은 시험물질의 경우 각 농도별로 혼합된 조제 사료를 공급하여 실험동물이 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며, Cy의 경우 체중 대비 개체당 동일량을 공급하기 위하여 증류수에 용해한 Cy (5 mg/kg)를 강제 경구 투여하였다.

4. 시험군 설정 및 시료 투여

사육기간 중 식이는 일반 고품사료(Samtako, Gyunggi, Korea)를 급여하며 순화기간이 끝난 실험동물은 체중값을 기준으로 난괴법을 사용하여 구간 평균값이 균일하도록 분리한 후 ear punch를 이용하여 개체식별 표시하였다. 실험군은 정상군(Normal group), 대조군(Control group, BYFP 0 group), 블루베리 효모 발효 분말 30 mg/kg 투여군(blueberry yeast fermented powder 30 mg/kg, BYFP 30 group), 블루베리 효모 발효 분말 100 mg/kg 투여군(blueberry yeast fermented powder 100 mg/kg, BYFP 100 group), 블루베리 효모 발효 분말 300 mg/kg 투여군(blueberry yeast fermented powder 300 mg/kg, BYFP 300 group)으로 구분하며 군당 10마리씩 실험에 사용하였다.

5. 주간 바이오마커 분석 및 부검

주간 체중변화는 주 1회 일정시간에 모든 실험군의 개체별 체중을 측정하였고 식이 섭취량은 급여 후 익일 잔량을 측정하여 주 1회 측정하였다. 부검은 ether로 마취 후 복대정맥에서 채혈하여 혈액 분석에 사용하였으며 간, 흉선, 비장 조직은 적출하여 중량을 측정하였고, 비장 조직만 formalin에 고정하였다.

6. 혈액 분석

혈액은 복대정맥에서 채혈하여 EDTA tube와 conical tube에 나눠 분석에 사용하였다. 일반 혈액학적 검사는 혈액을 EDTA tube (DB Caribe, Ltd., USA)에 담아 Roll mixer에 약 30분 회전시킨 후 혈액분석기(Hemavet 950Fs, Drew scientific inc, TX, USA)를 이용하여 백혈구(white blood cell), 임파구(lymphocyte), 호중구(neutrophill)를 측정하였다. 반면 Conical tube에 채혈하는 혈액은 cytokine 분석을 위해 상온에서 30분 응고시킨 후 원심분리기에 3000 rpm으로 10분 동안 분리하여 혈청을 회수하였다. 분리한 혈청은 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IFN- γ (interferon- γ), IL-2 (interleukin-2) 측정을 위하여 구입한 Biologend (San Diego, CA, USA)의 ELISA kit로 분석하였다.

7. 조직학적 분석

적출한 비장 조직은 10% formalin 액에서 고정시킨 검체를 절취하여(trimming) 재고정시킨 후 파라핀에 포매하여 4 μm 의 두께로 절편/세절하였다. Hematoxylin-eosin 염색은 xylene에서 파라핀을 제거하고 탈수 과정을 거친 후 hematoxylin에 4분, eosin에 2분 동안 염색하였다. 이후 봉입하여 염색된 조직 프레파라트는 광학현미경인 Olympus BX50 F4 (Olympus, Japan)를 이용하여 관찰 및 촬영하였다.

8. 통계 분석

실험 결과는 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 으로 표시하였으며, 통계 프로그램 (SPSS ver.12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균 \pm 표준오차(Mean \pm S.E.)로 계산하였다. 각 시험군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA (one-way analysis of variance test)를 실시한 후 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 미만일 때 Duncan's multiple range test로 사후 검정하였다.

결 과

1. 체중과 음수 및 식이 섭취량에 미치는 영향

각 실험군간 주간 체중 변화를 확인한 결과 증류수만을 투여한 정상군(Normal group)과 비교하여 cyclophosphamide (Cy)만을 투여한 대조군(Control group)은 Cy의 농도가 높아짐에 따라 증체율이 감소된 것으로 나타났다. 실험 종료시점인 4주차에 각 실험군별 체중은 정상군이 225.2 ± 3.8 g, 대조군이 209.6 ± 2.2 g로 Cy를 투여에 따라 체중이 유의하게 감소된 것으로 확인되었다. 반면 대조군과 비교하여 Cy와 블루베리 효모 발효 분말(blueberry yeast fermented powder, BYFP)을 30 mg/kg 투여한 실험군(BYFP 30 group)은 216.1 ± 1.6 g, Cy와 블루베리 효모 발효 분말 100 mg/kg 투여한 실험군(BYFP 100 group)은 211.7 ± 3.6 g, Cy와 블루베리 효모 발효 분말 300 mg/kg 투여한 실험군(BYFP 300 group)은 220.2 ± 1.7 g으로 나타나 블루베리 효모 발효 분말의 투여로 인하여 체중이 증가하는 경향을 보이거나 유의하게 증가된 것으로 조사되었다(Fig. 1A). 음수 및 식이 섭취량은 모든 그룹에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1B, C).

2. 면역억제 모델에서 장기 무게에 대한 영향

블루베리 효모 발효 분말이 면역 저하 모델의 조직 중량에 미치는 영향을 확인한 시험에서, 간 조직 중량은 정상군의 6.13 ± 0.04 g과 비교하여 대조군은 5.53 ± 0.03 g으로 유의하게 낮은 것으로 확인되었다. 반면 블루베리 효모 발효 분말을 투여한 시험군의 저농도 투여군(30 mg/kg)은 5.93 ± 0.02 g, 중농도 투여군(100 mg/kg)은 5.84 ± 0.05 g, 고농도 투여군(300 mg/kg)은 5.83 ± 0.03 g으로 모든 시험군에서 대조군에 비해 유의하게 증가한 것으로 확인되었다(Fig. 2A). 비장 조직의 경우 정상군은 0.49 ± 0.37 g으로 나타났으나 대조군은 0.37 ± 0.01 g으로 Cy 처리에 따라 조직 중량이 유의하게 감소한 것으로 확인되었다. 농도별 블루베리 효모 발효 분말을 처리한 실험군은 BYFP 30 시험군이 0.36 ± 0.01 g, BYFP 100 시험군이 0.37 ± 0.01 g, BYFP 300 시험

군이 0.41 ± 0.01 g으로 고농도 투여군에서 비장조직의 중량이 대조군보다 높은 수준을 보였으나 유의적인 차이는 없는 것으로 조사되었다(Fig. 2B). 흉선조직은 대조군이 0.28 ± 0.01 g으로 정상군의 0.46 ± 0.01 g과 비교하였을 때 Cy를 처리함에 따라 중량이 유의하게 감소된 것으로 나타났다. 대조군과 비교하여 BYFP 30 실험군과 BYFP 100 실험군은 각각 0.32 ± 0.01 g, 0.34 ± 0.01 g으로 유의한 차이를 보이지 않았으나, BYFP 300 실험군은 0.37 ± 0.01 g으로 대조군보다 유의하게 증가된 것으로 조사되었다(Fig. 2C).

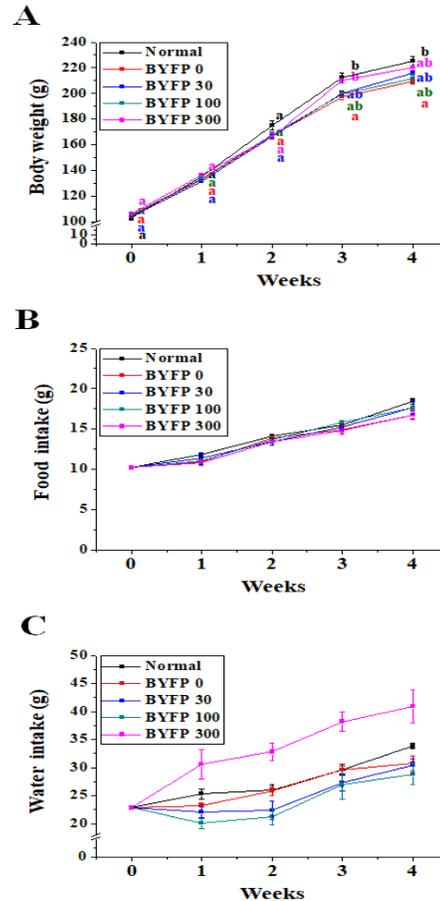


Fig. 1. Effects of BYFP on body weight and dietary style (food and water intake) in cyclophosphamide-induced immunosuppressed rats. (A) Changes in body weight over 4 weeks; (B) Food intake; (C) Water intake of BYFP. The data are shown as $\text{mean} \pm \text{S.E.}$. ^{a-b}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups ($p < 0.05$). Normal, Wild type; BYFP 0, Cy-treated immunosuppression control; BYFP 30, blueberry yeast fermented powder 30 mg/kg with Cy treatment; BYFP 100, blueberry yeast fermented powder 100 mg/kg with Cy treatment; BYFP 300, blueberry yeast fermented powder 300 mg/kg with Cy treatment.

3. 면역억제 모델의 혈구세포에 미치는 영향

각 실험군별 혈중 백혈구(White blood cell, WBC) 수치는 정상군의 $4.87 \pm 0.14 \times 10^9/\text{L}$ 와 비교하여 Cy를 투여한 대조군은 $1.97 \pm 0.05 \times 10^9/\text{L}$ 으로 유의하게 낮은 수준을 보였다. 반면 블루베리 효모 발효 분말과 Cy를 함께 투여한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 BYFP 30 실험군은 $2.57 \pm 0.07 \times 10^9/\text{L}$ 로 높은 경향을 보였으

며, BYFP 100 실험군은 $2.89 \pm 0.08 \times 10^9/L$, BYFP 300 실험군은 $3.54 \pm 0.05 \times 10^9/L$ 로 혈중 백혈구 수치가 유의하게 증가한 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 혈중 림프구(lymphocyte, LYM) 함량의 경우 정상군의 $3.50 \pm 0.09 \times 10^9/L$ 에 비해 대조군이 $1.17 \pm 0.04 \times 10^9/L$ 으로 유의적으로 낮게 조사되었다. 블루베리 효모 발효 분말을 투여한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 BYFP 30 실험군은 $1.57 \pm 0.04 \times 10^9/L$ 으로 높은 경향을 보였으며, BYFP 100 실험군은 $2.00 \pm 0.06 \times 10^9/L$, BYFP 300 실험군은 $2.41 \pm 0.03 \times 10^9/L$ 으로 유의하게 높은 수준을 보이는 것으로 조사되었다(Fig. 3B). 혈중 호중구(neutrophil, NEUT)의 함량을 비교해보면 정상군은 $1.10 \pm 0.04 \times 10^9/L$, 대조군은 $0.63 \pm 0.01 \times 10^9/L$ 로 Cy를 투여함에 따라 호중구의 함량이 크게 감소한 것으로 나타났다. 반면 블루베리 효모 발효 분말을 투여한 실험군의 경우 BYFP 30 실험군은 $0.71 \pm 0.03 \times 10^9/L$ 로 대조군과 비교하여 증가하는 경향을 보였고, BYFP 100 실험군은 $0.87 \pm 0.02 \times 10^9/L$, BYFP 300 실험군은 $0.92 \pm 0.02 \times 10^9/L$ 로 유의하게 높았다(Fig. 3C).

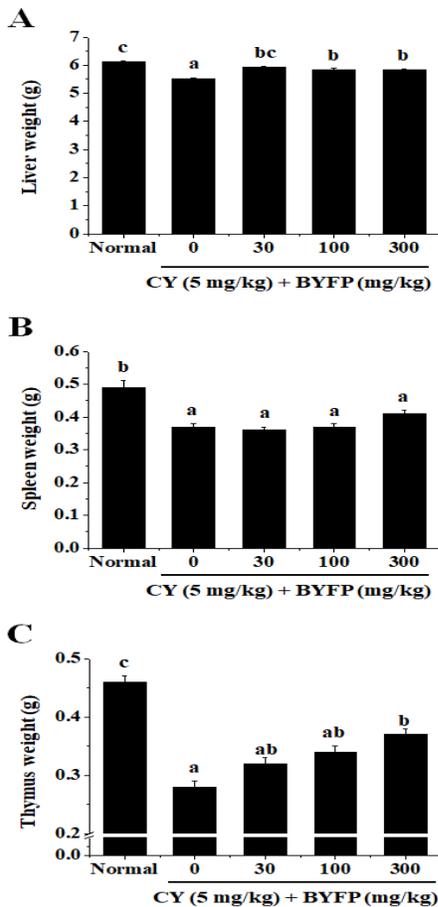


Fig. 2. Effects of BYFP on weight of liver, spleen, and thymus in Cy-treated rats. (A) Changes in organ weight of liver; (B) spleen; (C) thymus. The data are shown as mean±S.E.. ^{a-c}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups (p<0.05). Normal, Wild type; BYFP 0, Cy-treated immunosuppression control; BYFP 30, blueberry yeast fermented powder 30 mg/kg with Cy treatment; BYFP 100, blueberry yeast fermented powder 100 mg/kg with Cy treatment; BYFP 300, blueberry yeast fermented powder 300 mg/kg with Cy treatment.

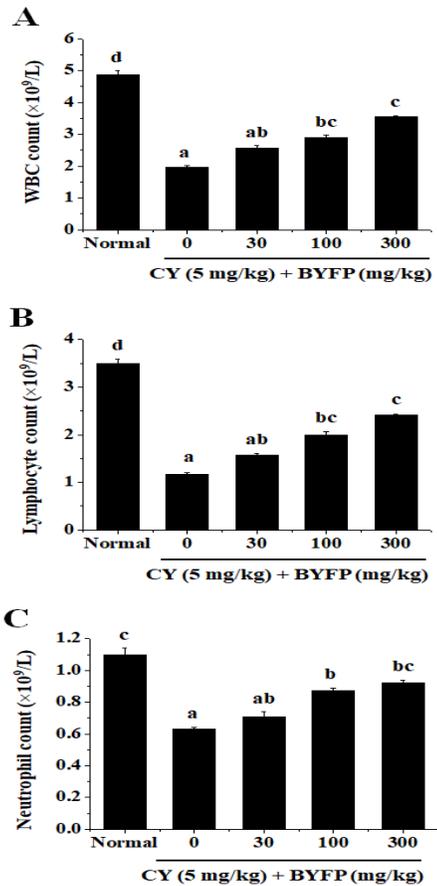


Fig. 3. Effects of BYFP on blood components in Cy-treated rats. Complete blood cell count (CBC) test was conducted by blood analyzer. (A) Changes in white blood cell; (B) lymphocytes; (C) neutrophil. The data are shown as mean±S.E.. ^{a-d}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups (p<0.05). Normal, Wild type; BYFP 0, Cy-treated immunosuppression control; BYFP 30, blueberry yeast fermented powder 30 mg/kg with Cy treatment; BYFP 100, blueberry yeast fermented powder 100 mg/kg with Cy treatment; BYFP 300, blueberry yeast fermented powder 300 mg/kg with Cy treatment.

4. 면역관련 cytokines 생성 측정

Cy에 의한 면역 저하 동물모델의 혈중 TNF- α 함량에 미치는 영향을 분석한 결과 정상군은 7.6 ± 0.3 pg/ml로 대조군의 5.7 ± 0.2 pg/ml와는 유의적인 차이를 보였다. 반면 블루베리 효모 발효 분말을 투여한 실험군의 경우 BYFP 30 실험군은 8.2 ± 0.2 pg/ml로 정상군과 유사한 수준을 보였고, BYFP 100 실험군과 BYFP 300 실험군은 각각 9.4 ± 0.5 pg/ml, 10.5 ± 0.4 pg/ml로 대조군과 정상군보다 유의하게 증가한 것으로 확인되었다(Fig. 4A). 각 실험군별 혈중 IFN- γ 의 함량을 분석한 결과 정상군은 32.1 ± 8.0 pg/ml로 대조군의 12.3 ± 6.8 pg/ml보다 높은 수준을 보였다. 반면 블루베리 효모 발효 분말을 투여한 실험군은 BYFP 30 실험군은 16.9 ± 4.2 pg/ml, BYFP 100 실험군은 25.0 ± 4.4 pg/ml로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나 BYFP 300 실험군은 49.7 ± 7.9 pg/ml로 대조군과 유의한 차이를 보였다(Fig. 4B). 혈중 IL-2의 함량을 비교하여 보면 정상군은 43.1 ± 1.2 pg/ml, 대조군은 36.7 ± 0.8 pg/ml

로 유의적인 차이를 보였다. Cy와 블루베리 효모 발효 분말을 투여한 실험군에서 BYFP 30 실험군은 38.9 ± 1.2 pg/ml, BYFP 100 실험군은 39.3 ± 0.7 pg/ml로 대조군보다는 높은 경향을, BYFP 300 실험군은 40.1 ± 0.9 pg/ml로 대조군보다 유의하게 증가된 것으로 확인되었다(Fig. 4C).

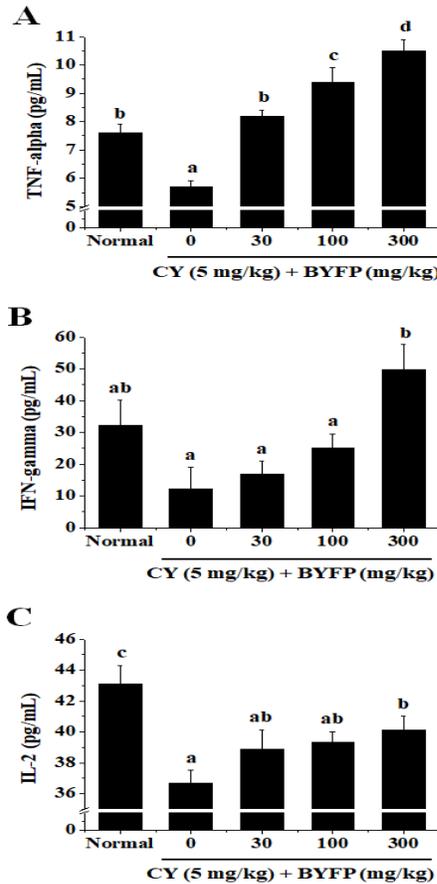


Fig. 4. Effects of BYFP on cytokine expression levels of TNF- α , IFN- γ , and IL-2 in the sera were determined by ELISA. Cytokine concentration of TNF- α (A), IFN- γ (B) and IL-2(C). The data are shown as mean \pm S.E.. ^{a-d}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups ($p < 0.05$). Normal, Wild type; BYFP 0, Cy-treated immunosuppression control; BYFP 30, blueberry yeast fermented powder 30 mg/kg with Cy treatment; BYFP 100, blueberry yeast fermented powder 100 mg/kg with Cy treatment; BYFP 300, blueberry yeast fermented powder 300 mg/kg with Cy treatment.

5. 조직학적 분석

본 연구에서는 블루베리 효모 발효 분말이 Cy 처리에 따른 비장의 기능변화에 미치는 영향을 확인하기 위해 각 실험군별 비장조직 병변을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 정상군의 비장 조직은 중심정맥(central vein, CA) 주변으로 백색수질이 고르게 분포되어 있으며, 림프소절(lymph nodule, LN)이 가장자리 구역(marginal zone, MZ)에 둘러싸여 있어 적색수질(red pule, RP)과의 경계가 명확하게 구분된 것으로 관찰되었다(Fig. 5A). 반면 Cy를 처리한 대조군의 경우 가장자리 구역의 경계가 명확하지 않아 현저한 백색수질의 붕괴가 확인되었으며 적색수질에서는 응축된 세포들이 관찰되고 그 배열 또한 매우 불규칙한 것으로 나타났다

(Fig. 5B). 반면 블루베리 효모 발효 분말을 투여한 실험군의 비장 조직을 관찰한 결과 BYFP 30 실험군에서는 대조군과 비교하여 크게 호전되지는 않았으나 백색수질의 붕괴가 감소되어 국소적으로 선명한 가장자리 구역이 관찰되었으며(Fig. 5C), BYFP 100 실험군에서는 조직 전반에 적색수질 주변의 가장자리 구역이 명확하게 구분되어 대조군에서 관찰되던 백색수질의 붕괴는 거의 확인되지 않았다(Fig. 5D). 특히 블루베리 효모 발효 분말을 고농도로 투여한 BYFP 300 실험군의 경우 Cy 처리에 의한 백색수질의 붕괴 및 적색수질의 세포 응축 현상은 크게 호전되었으며 전체적으로 조직 내 가장자리 구역이 선명하게 관찰되어 매우 양호한 상태를 보이는 것으로 관찰되었다(Fig. 5E).

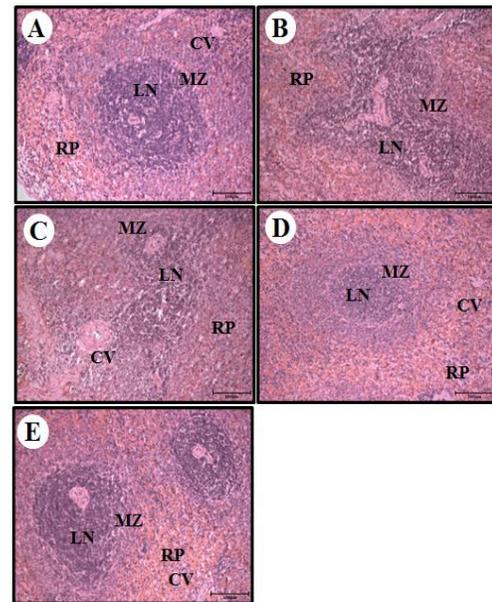


Fig. 5. Effects of BYFP on histological feature of spleen. Spleens were stained with hematoxylin and eosin reagent and observed by optical microscope. Original magnification: $\times 100$. scale bar = 100 μ m. (A) Normal; (B) BYFP 0 (Control); (C) BYFP 30; (D) BYFP 100; (E) BYFP 300. Normal, Wild type; BYFP 0, Cy-treated immunosuppression control; BYFP 30, blueberry yeast fermented powder 30 mg/kg with Cy treatment; BYFP 100, blueberry yeast fermented powder 100 mg/kg with Cy treatment; BYFP 300, blueberry yeast fermented powder 300 mg/kg with Cy treatment.

고 찰

체내 면역기능이 저하된 상태에서 병의 감염이나 발생이 일어나기 때문에 면역반응의 균형이 깨지거나 그 기능이 저하된 환경에서 천연물 유래 생리활성물질을 통해 이들 면역 반응을 증진시킬 수 있는 다양한 연구가 이루어지고 있다. 항암치료 및 면역성질환 치료를 위해 처방되었던 합성의약품의 부작용으로 세포독성 및 생물학적 안정성의 문제가 대두되면서 항산화, 항염증, 항암 등, 생리활성기능이 탁월하다고 알려진 폴리페놀을 다량 함유한 장과류에 관심을 갖고 기능성은 물론, 면역조절제로서 연구하는 추세이다. 장과류 중 하나인 블루베리는 진달래과(Ericaceae), 산앵두나무속(Vaccinium)에 속하는 관목성 식물로서 노화방지, 뇌기능보호, 혈압완화, 콜레스테롤개선, 소화기능, 체중감량 및 피부미용에도 효과

가 있다고 알려져 있다¹⁴⁻²¹).

본 연구는 Cyclophosphamide (Cy)에 의해 체내 면역기능이 저하된 동물 모델에서 블루베리 효모 발효 분말의 섭취농도를 30, 100, 300 mg/kg으로 달리하여 각 농도에서 면역조절기능에 어떠한 효과를 보이는지 검증하기 위해 수행되었다.

Cy는 림프종, 골수종, 백혈병과 같은 혈액종양 및 최근 조혈모세포 이식 전 치료제의 역할을 하는 알킬레이션 유도제로 알려져 있다. 하지만 그 부작용으로 체중 감소, 간 기능 장애 등을 유발할 수 있다고 보고되고 있다²²⁻²⁵. 본 실험에서도 정상 대조군에 비해 Cy처리 면역억제 대조군은 실험 시작일부터 유의미한 체중 감소가 확인되었고, 매주 측정된 증체량 역시 현저하게 감소하는 경향을 확인하였다. BYFP를 농도별로 투여한 실험군에서는 블루베리 효모 발효 분말 투여로 인하여 체중과 증체량의 감소가 억제되는 것이 확인되었으며(Fig. 1A), Cy에 의한 체내 면역저하는 실험동물이 섭취하는 식이, 음수량의 변화에 영향을 주지는 않는 것으로 나타났다(Fig. 1B, C). Cy나 tetrahydrocannabinol (THC)를 처리하여 체내 면역저하를 유도하게 되면, 면역기관인 비장, 흉선은 그 무게가 감소한다는 것이 보고된 바가 있고^{26,27}, 간 역시 면역이 억제된 환경에서 정상 대조군에 비해 무게가 감소한다는 것이 알려져 있다²⁸. 이처럼 Cy처리 면역억제 대조군과 BYFP 농도별 투여군에서 간, 비장, 흉선의 조직중량을 측정된 결과, 세 기관 모두에서 유의한 무게 증가가 관찰되었다(Fig. 2). Cy에 의해 유도되는 면역억제는 혈액 조성의 변화를 일으키며 적혈구, 백혈구, 혈소판은 물론 세부적으로 림프구와 호중구 감소를 유도하는 것으로 알려져 있고²⁹, Cy에 의해 유도되는 면역억제는 혈액 조성의 변화를 일으키며 적혈구, 백혈구, 혈소판은 물론 세부적으로 림프구와 호중구 감소를 유도하는 것으로 알려져 있다²⁹. 일반적으로 Cy를 비장 및 흉선 세포의 DNA를 알킬레이션시켜 면역세포(T, B림프구 등)의 반응을 억제하는 기전을 이용하여 자가면역질환의 치료제로 이용되고 있지만, 이 과정에서 부작용으로 골수형성이상증후군(Myelodysplastic syndrome)이 발생할 수 있다. 골수형성이상증후군은 골수조혈작용의 오류를 초래하여 백혈구감소증(Leukopenia) 발병의 주요 원인으로 보고되어 있다³⁰. 일반혈액검사서서 혈중 백혈구 수, 림프구 수, 호중구 수가 정상대조군에 비해 Cy 처리 면역억제군에서 현저한 감소가 확인되었으며, BYFP 투여군에서는 농도의존적으로 Cy에 의해 유도되는 혈액학적 저해작용이 유의미하게 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 3). 이러한 결과는 블루베리 효모 발효 분말의 투여가 면역기능 회복 및 조혈작용 개선효과가 있음을 증명하는 근거가 될 수 있다.

비장세포를 포함한 여러 세포에서 생성되는 cytokine의 하나인 TNF- α (tumor necrosis factor- α)는 면역세포인 T 림프구의 분화유도에 중요한 역할을 하며, 항체 생산을 촉진하는 것으로 알려진 IL-2 (interleukin-2)를 촉진하여 세포성 면역을 활성화시킨다. 그리고 면역억제제인 Cy는 혈액 및 골수의 림프구의 수를 감소시켜 세포에서 생산해내는 cytokine의 분비를 억제시키는 것으로 밝혀진 바 있다³¹. IFN- γ 은 Th1 세포, T 림프구, NK세포에서 생산되며, T 세포의 기능에 영향을 미치고 macrophage의 기능을 강화시키는 것으로 알려져 있다³². 본 실험의 결과 혈액 내의

면역조절 cytokine인 TNF- α , IL-2 그리고 IFN- γ 의 혈중 농도를 ELISA를 통해 비교 분석하였을 때, 정상 대조군에 비하여 Cy처리 면역억제군에서 모든 cytokine 함량의 감소가 관찰되었고, BYFP 투여군은 농도의존적으로 함량이 유의미한 증가를 보였다(Fig. 4). 조직병리학적 분석을 통하여 BYFP 투여가 Cy 처리에 의해 발생한 비장조직의 기능 및 형태적인 변화를 관찰해보았다. 일반적으로 Cy를 처리하게 되면 비장의 중심정맥과 주변의 백색수질, 림프소절, 적색수질의 경계가 명확하게 구분되는 것으로 알려져 있다³³. 본 실험의 정상 대조군은 중심정맥을 기준으로 백색수질의 분포가 고르며, 림프소절이 적색수질과 명확한 경계로 구분된다(Fig. 5A). 반면 Cy처리 대조군은 백색수질이 손상되어 경계가 명확하게 나뉘지 않았으며, 적색수질에서는 세포들이 응집된 형태로 관찰되었으며, 배열이 불규칙함을 관찰할 수 있었다(Fig. 5B). 또한 BYFP를 저농도(30 mg/kg)로 투여한 실험군에서는 조직의 형태가 Cy처리 대조군과 크게 다르지 않았지만, 백색수질의 손상이 감소하는 것이 확인되었고(Fig. 5C), BYFP를 중농도(100 mg/kg)으로 처리하였을 때 전반적인 조직 재생이 진행되어 적색수질이 명확히 구분되기 시작하고 백색수질의 붕괴가 거의 사라졌다(Fig. 5D). BYFP를 고농도(300 mg/kg)로 투여한 실험군은 Cy처리 대조군에서 발생한 백색수질의 붕괴 및 적색수질의 세포 응집반응이 크게 감소하였고, 전반적으로 조직 내 가장자리 부분이 선명하게 구분되어 상당히 호전된 상태를 보이는 것으로 판단되었다(Fig. 5E).

이상의 결과들을 종합해보면, 블루베리 효모 발효 분말의 투여는 Cy처리를 통해 손상된 체내 골수기능과 면역기능을 활성화시켜 정상 대조군에 비해 감소된 체중 및 간, 비장, 흉선의 조직중량, 혈구세포 구성, 혈액 내 면역관련 cytokine의 함량을 전반적으로 회복시켜 면역질환의 예방과 치료를 위한 가능성을 확인하였다.

결론

본 연구는 cyclophosphamide를 처리하여 면역억제를 유도하며 4주간 블루베리 효모 발효 분말을 함께 투여했을 때 전반적인 면역기능 개선과 동시에 조직 손상도 재생되는 것을 확인하였다. Cy처리 대조군에 고농도의 BYFP를 공급하였을 때, 저하된 체중 증가량(증체량)과 감소된 혈구세포가 정상범위만큼 회복되었다. 또한 T 세포 분화에 중요한 역할을 하는 cytokine들의 생산도 농도의존적으로 증가하였으며, 면역 저하에 따른 조직 손상 및 붕괴된 부위가 재생되는 것을 확인하였다. BYFP는 Cy처리로 유도된 면역저하모델에서 면역증강 효과를 보여주어 향후 천연물 유래 면역증강제(immunostimulator)로서의 역할이 가능할 것으로 기대되며, 추후 제형 및 발효 공정의 개선을 통해 품질의 향상 연구를 통해 면역질환으로 고통 받는 환자들에게 좋은 보조제가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 순창군 향토건강식품명품화사업의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

1. Son CK. The research of immunological function in liver. *J Korean Oriental Med.* 2001;22(1):3-9.
2. Kim MS, Kim JS, Ryu MJ, Kim KH, Hwang K. Immunomodulation effects of β -1,3/1,6-glucan and lactic acid bacteria in LP-BM5 murine leukemia viruses-induced murine acquired immune deficiency syndrome. *Korean J Food Preserv.* 2017;24(8):1158-67.
3. Arthym J, Zimecki M, Kruzel M. Normalization of peripheral blood cell composition by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice. *Med Sci Monit.* 2004;10(3):BR84-9.
4. Senthikumar S, Devaki T, Manohar BM, Babu MS. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin Chim Acta.* 2005;364:335-42.
5. Schwenke DC. Focus on fruits and vegetables to reduce cardiovascular disease and all-cause mortality. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24:526-7.
6. Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1577-84.
7. Bazzano LA, Serdula MK, Liu S. Dietary intake of fruit and vegetables and risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep.* 2003;5:492-9.
8. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:230S-42.
9. Xu W, Zhou Q, Yao Y, Li X, Zhang JL, Su GH. Inhibitory effect of Gardenblue blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) anthocyanin extracts on lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Journal of Zhejiang University Science B.* 2016;17:425-36.
10. Wan C, Yuan T, Cirello AL, Seeram NP. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers. *Food Chemistry.* 2012;135:1929-37.
11. Brambilla A, Lo Scalzo R, Bertolo G, Torreggiani D. Steam-blanching highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice: Phenolic profile and antioxidant capacity in relation to cultivar selection. *J Agric Food Chem.* 2008;56:2643-48.
12. Nagao K, Higa K, Shirouchi B, Nomura S, Inoue N, Inafuku M. Effect of *Vaccinium ashei* reade leaves on lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry.* 2008;6:1619-22.
13. Cho CW, Lee KY, Kim YC, Han CH. Immunomodulatory effects of polysaccharides derived from persimmon leaves on cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Korea J Food Sci Technol.* 2013;45:636-41.
14. Xue ZH, Gao J, Zhang ZJ, Yu WC, Wang H, Kou XH. Antihyperlipidemic and antitumor effects of chickpea albumin hydrolysate. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2012;67:393-400.
15. Rodriguez-Mateos A, Cifuentes-Gomez T, George TW, Spencer JPE. Impact of cooking, proving, and baking on the (poly)phenol content of wild blueberry. *J Agric Food Chem.* 2014;62:3979-86.
16. Cordova FM, Watson RR. Food and supplement polyphenols action in cancer recurrence. San Diego Academic Press. 2014:191-5.
17. Jiang MH, Zhu L, Jiang JG. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin Ther Tar.* 2010;14:1367-1402.
18. Zhao C, Li M, Luo Y, Wu W. Isolation and structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from fuzi, *Aconitum carmichaeli*. *Carbohydr Res.* 2006;341:485-91.
19. Chen Y, Tang J, Wang X, Sun F, Liang S. An immunostimulatory polysaccharide (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Int J Biol Macromol.* 2012;50:844-8.
20. Guo L, Liu J, Hu Y, Wang D, Li Z, Zhang J. Astragalus polysaccharide and sulfated epimedium polysaccharide synergistically resist the immunosuppression. *Carbohydr Polym.* 2012;90:1055-60.
21. Park HR, Lee MS, Jo SY, Won HJ, Lee HS, Lee H. Immuno-stimulating activities of polysaccharides isolated from commercial soy sauce and traditional Korean soy sauce. *Korean J Food Sci Technol.* 2012;44:228-34.
22. Angulo I, de las Heras FG, Garcia-Bustos JF, Gargallo D, Munoz-Fernandez MA, Fresno M. Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ERMP12)(+) cells in the spleen of cyclophosphamide-treated mice: Implications for T cell responses in immunosuppressed mice. *Blood.* 2000;95:212-20.
23. Nonaka Y, Ishibashi H, Nakai M, Shibata H, Kiso Y, Abe S. Effects of the antlered form of *Ganoderma lucidum* on tumor growth and metastasis in cyclophosphamide-treated mice. *Biosci Biotechnol*

- Biochem. 2008;1399-1408.
24. Sadeghi B, Jansson M, Hassan Z, Mints M, Hagglund H, Abedi-Valugerdi M. The effect of administration order of BU and CY on engraftment and toxicity in HSCT mouse model. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:895-904.
 25. Wang BX, Zhao XH, Qi SB, Kaneko S, Hattori M, Namba T. Effect of repeated administration of biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. *Chem Pharm Bull.* 1988;36:2587-92.
 26. McKallip RJ, Lombard C, Martin BR, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Delta(9)-tetrahydrocannabinol -induced apoptosis in thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:451-65.
 27. Miyauchi A, Hiramane C, Tanaka S, Hojo K. Differential effects of a single dose of cyclophosphamide on T cell subsets of the thymus and spleen in mice: Flow cytometry analysis. *Tohoku J Exp Med.* 1990;162:147-67.
 28. El-Naggar SA, Alm-Eldeen AA, Germoush MO, El-Boray, KF, Elgebaly HA. Ameliorative effect of propolis against cyclophosphamide-induced toxicity in mice. *Pharmaceutical Biology.* 2015;53:235-41.
 29. Son CG, Han SH, Cho JH, Shin JW, Cho CH, Lee YW. Induction of hemopoiesis by saenghyuldan, a mixture of Ginseng radix, Paeoniae radix alba, and Hominis placenta extracts. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24:120-6.
 30. Pang WW, Pluvinaige JV, Price EA, Sridhar K, Arber DA, Greenberg PL. Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110:3011.
 31. Logani MK, Alekseev S, Bhopale MK, Slovinsky WS, Ziskin MC. Effect of millimeter waves and cyclophosphamide on cytokine regulation. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012;34:107-12.
 32. Marcinkiewicz J, Bryniarski K, Ptak W. Cyclophosphamide uncovers two separate macrophage subpopulations with opposite immunogenic potential and different patterns of monokine production. *Cytokine.* 1994;6:472-7.
 33. Bremer J, Heikenwalder M, Haybaeck J, Tiberi C, Krautler NJ, Kurrer MO. Repetitive immunization enhances the susceptibility of mice to peripherally administered prions. *Plos One.* 2009;4:7160.