大韓本草學會誌 제32권 제1호(2017년 1월)
Kor. J. Herbol. 2017 ; 32(1) : 1-13

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2017.32.1.1.

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

이지은[1#], 노성수[3], 김한영[2], 김근회[2], 김승형[1*]

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

Enhancement of Immune Activities of *Canavalia gladiata* & *Arctium lappa* complexes in immobilization stress mouse model.

Ji-eun Lee[1#], Seong-Soo Roh[3], Han-Young Kim[2], Kun-hoae Kim[2], Seung-Hyung Kim[1*]

1 : Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea
2 : Central Research Laboratories of Aekyung industrial Co.Ltd., Daejeon, Korea
3 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea

ABSTRACT

Objective : Soybeans of *Canavalia gladiata*(CG) and root of *Arctium lappa*(AL) have been reported to have anti-inflammatory, antioxidant effect. However, the immunoregulatory mechanisms of its combinational prescription remain a matter of considerable debate. In the current study, we investigated whether CG and AL and its combinational prescription(CG+AL) regulate immune system using chronic immobilization-stress mouse model.

Methods : C57BL/6J mice fixed for 2 hours into immobilization tube after CG, AL, CG+AL oral administration after 2 hours daily for 21 days. After every experiment has ended the C57BL/6J mice were sacrificed on 22 days. The production of Serotonin and Cortisol, lgA were observed by ELISA method, The proportion of immune cells such as T/B cell and macrophage, NK cell were measured by FACS. Then, Real-time PCR was performed to measure the mRNA expression of Inflammatory cytokines(IL-1beta, IL-6, TNF-a) and T cell activation cytokines(IL-2, IL-10, IFN-gamma, IL-12p35 / p40).

Result : When chronic immobilization-stress mouse model were treated with CG+AL(1:4), the expression of mRNA were significantly decreased at the Inflammatory cytokines(IL-1beta, IL-6, TNF-a). While, the levels of mRNA were significantly increased at immune T cell activation cytokines. Additionally, CG+AL(1:4) combinational prescription group enhanced immune cells such as T/B cell and macrophage, NK cell. Furthermore, the Immuno-fluorescence result of brain tissue can confirm that CG+AL(1:4) group significantly increased the BDNF expression.

Conclusion : These result suggest that CG+AL(1:4) combinational prescription has Immune System enhancement via stress-mediated immunocyte.

Key words : Enhancement of Immune Activities, soybeans of *Canavalia gladiata* DC semen, root of *Arctium lappa*, chronic immobilization-stress, Cytokine

Ⅰ. 서 론

최근 현대인의 건강 위협 요인 중 하나로 스트레스가 주목받고 있다. 스트레스는 우리 몸의 정신적, 신체적 피로와 다양한

*Corresponding author : Seung-Hyung Kim. Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 300-716, Republic of Korea.
· Tel : +82-42-280-2642 · Fax : +82-42-274-2600 · E-mail : sksh518@dju.kr
#First author : Ji-Eun Lee. Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 300-716, Republic of Korea.
· Tel : +82-42-280-2646 · Fax : +82-42-274-2600 · E-mail : wldsm@dju.kr
· Received : 10 November 2016 · Revised : 29 November 2016 · Accepted : 15 January 2017

스트레스 요인으로 인한 체내의 생리적 기능의 변화를 뜻한다. 따라서 스트레스는 지속적인 육체 피로 및 정신적 피로를 총괄하는데, 대개 특별한 원인 없이 현대인의 바쁜 생활과 지속적인 대인관계, 복잡한 사회생활에서 기인한다고 알려져 있다[1]. 우리가 스트레스 요인에 노출될 때, 뇌는 항상성을 유지하기 위해 다양한 전달물질(Transmitters)과 펩타이드(Peptides), 호르몬 등을 방출한다[2]. 스트레스와 면역 반응에 관여하는 인터루킨-1(Interleukin-1)은 면역 반응 시 가장 먼저 분비되어 염증을 유발한다. 우리 몸은 스트레스에 대하여 교감신경계와 시상하부-뇌하수체-부신축(HPA axis, hypothalamic-pituitary-adrenal)의 작용으로 반응한다[3]. 스트레스는 뇌하수체 전엽에 작용하여 HPA axis를 활성화시키고 ACTH(부신 피질 자극 호르몬)의 생성을 촉진해 부신 피질로부터 당질 코르티코이드(Glucocorticoid)를 분비를 촉진시킨다[4]. 또한 스트레스는 카테콜아민(Catecholamine)과 당질코르티코이드를 분비시켜 감정, 인지기능 등에 많은 영향을 미친다고 알려져 있다[5]. 당질코르티코이드는 항염증 작용과 함께 대식세포의 수와 활성을 감소시키며, 인터루킨의 생성을 억제하며, 림프구의 반응을 약화시킨다. 따라서 당질코르티코이드의 분비가 지속적으로 증가하게 되면 면역반응이 저하되고 질병에 대한 저항성도 감소하게 된다. 만성 스트레스가 면역 기능을 저하하게 되면 건강에 위협을 가져오는 이유가 여기에 있다. 또한 스트레스가 유발될 때에는, 인체에서는 코르티솔을 분비하여 대사율을 떨어뜨리게 된다[6]. 이러한 스트레스로 인한 질병들로부터 건강을 지키기 위한 수단으로, 질병이 발병된 후 실시하는 적극적인 치료와는 차별화되게, 미리 위험요인을 방어하기 위한 수단으로 다양한 건강기능성 식품이 활용되는 추세이다. 따라서 질병의 치료보다는 예방 개념으로 식품을 섭취하는 건강 기능성 식품이 다양하게 개발되고 있으며, 오래전부터 그 기능성이 검증되어 온 식품 재료들은 건강 기능성 식품 개발에 좋은 원료가 되고 있다[7].

본 연구는 아직 광범위하게 다루어지지 않은 식물 유래 추출물의 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하고자 하였다. 刀豆(*Canavalia gladiata*)는 콩과 한해살이 덩굴성 식물이며 원산지는 동남아시아 열대지방이다. 국내에서는 6~7월경에 개화하고, 8~10월에 꼬투리를 맺고 늦가을에 열매가 익으며, 열매의 콩깍지의 모양이 작두날을 닮았다고 하여 작두콩이라 부른다[8]. 식용 두류(흰콩, 검정콩, 완두콩, 강낭콩, 밤콩 등) 가운데 열매인 콩이 제일 큰 품종이며, 우리나라에서는 아직 刀豆에 대한 생산, 소비량에 대한 정확한 통계는 없는 실정이며, 주로 입소문으로 통해 소비와 판매가 이루어지고 있다. 민간요법에서는 축농증, 치질, 종기 등 화농성 염증을 치료하는 특효약으로 주로 사용되어 왔다[9]. 또한 한의학에서 작두콩 열매는 刀豆로 불리며 益腎補元, 溫中, 下氣의 효능으로 虛寒으로 인한 呃逆, 嘔吐, 腹脹, 腎虛腰痛, 痰喘 등에 활용되는 한약재이다[10]. 이러한 刀豆의 우수한 기능성을 바탕으로 중국에서 刀豆를 발효시켜 개발한 음료가 건강보조제로 국내에 소개된 적이 있고, 일본에서는 刀豆에 질경이, 율무, 산치자, 예덕나무를 배합해 만든 건강차가 제품 제작, 판매되기도 하였다[11]. 최근에는 刀豆가 암, 염증, 만성신장염과 빈혈 예방에 효과적이라고 보고된바 있으며[12,13], 그 외에도 항산화, 항균작용 및 항당뇨 등에도 효능이 있다고 보고된바 있다[14,15,16]. 하지만 이러한 효능들을 발현하는 활성 성분에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 천연물에는 규명되지 않은 다양한 성분이 존재하기 때문에, 활성 성분을 발견하고 그 성분의 효과를 증대시킬 수 있는 연구를 진행할 필요성이 있다. 또한 우엉(*Arctium lappa*)은 초롱꽃목 국화과의 두해살이식물이며 약용과 식용으로 재배되고 있는 야생초이다. 섬유질이 풍부하며 당질이 주성분인 알칼리식품으로 약리효과가 있는 것으로 알려져 있다. 우엉은 다양한 질환에 대해 많은 치료 효과를 가지고 있는 성분들로 구성되어 있어서 항암, 항종양, 항당뇨, 항바이러스 및 항염증효과와 같은 광대한 범위에서 임상적으로 사용할 수 있다고 알려져 있다[17,18]. 한의학에서 우엉의 종자는 牛蒡子, 줄기와 잎은 牛蒡莖葉, 뿌리는 牛蒡根으로 불리며, 祛風熱, 解毒消腫의 효능으로 風熱咳嗽, 咽喉腫痛 등의 증상에 활용되는 한약재이다[10].

따라서 본 연구에서는 식물 유래 추출물인 刀豆와 牛蒡根 추출물의 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하며, 刀豆, 牛蒡根 추출물을 혼합하였을 때 상승효과로 나타나는 스트레스 매개 면역조절 효과를 평가하고자 하였다. 나아가 刀豆와 牛蒡根의 기능성 식품으로의 활용 가능성을 확인하여 기능성 식품의 개발에 도움이 되고자 연구하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료수집

刀豆는 ㈜콩세상(충북 제천, 한국)에서 구입하여 사용하였으며, 牛蒡根은 갑당약초(충북 제천, 한국)에서 구입하여 사용하였다.

2. 재료추출 및 제조

刀豆 원물 100kg(비중 0.625)을 Knife hammer mill 분쇄기(20mm 타공판 장착)를 이용하여 10mm 이하로 조분쇄(비중 0.55)하였다. 원물 대비 3배의 상수를 첨가하여 24시간 동안 팽윤, 연화시킨 후 colloid mill로 2회 순환하며 미분쇄하여 콩물을 제조하였다. 2㎥ 교반조에 미분쇄 刀豆와 주정을 투입하여(최종 70.4%EtOH) 액온 27~30℃에 47시간 동안 교반추출하였다. 잔사를 분리하기 위해 교반 추출액을 3,800rpm 연속 원심분리기(데칸터)로 1차 원심분리 한 후, 1차 분리액을 7,800rpm 연속원심분리기(알파라발)로 직렬 원심분리하였다. 2차 분리액을 1㎛ cartridge 필터로 여과하였다. 여과액을 40℃에서 자연순환 농축기와 교반 농축기를 이용하여 농축시킨 후 100Mesh screen Pass로 농축액을 획득하였다. 동결건조를 위해 -40℃에서 12시간 동안 동결시킨 후 16시간 동안 승화 건조시키고 40℃에서 3일동안 건조시켰다. 이후 미생물 시험(건조 필름법)을 통해 대장균군은 음성반응, 일반세균은 450cfu/g임을 확인하였다.

牛蒡根 건조 원물 100kg을 순환추출기에 주정과 함께 투

입하여(최종 70.5%EtOH) 19~38℃에서 24시간 동안 1차 추출한 후 23~39℃에서 24시간 동안 2차 추출하였다. 추출 여액을 분리하여 75㎛, 1㎛ cartridge 필터로 여과하였다. 여과액을 40℃에서 자연순환 농축기를 이용하여 농축시킨 후 100Mesh screen Pass로 농축액을 획득하였다. 동결 건조를 위해 −40℃에서 10시간 동안 동결시킨 후 16시간 동안 승화 건조시키고 40℃에서 3일동안 건조시켰다. 이후 미생물 시험(건조 필름법)을 통해 대장균군은 음성반응, 일반세균은 260cfu/g임을 확인하였다. 刀豆 및 牛蒡根 70%에탄올 추출물의 대량생산시스템 구축을 위해 (주)테코스에 의뢰하였으며, 각 원료에 제조보고서를 받았다. 대량생산한 원료의 성상, 영양성분, 유해물질 여부를 확인하기 위해 건강기능식품연구원에 의뢰하여 최종 물질의 유해성이 없음을 확인하였다.

3. HPLC 분석

HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 water는 HPLC용 특급 용매로, trifluoroacetic acid(TFA)는 분석용 등급의 용매로 각각 J.T. Baker(USA)와 ㈜대정화금에서 구입하였다. Chlorogenic acid과 Chicoric acid 표준품들은 ㈜케이오씨바이오텍(전민동, 한국)으로부터 구입하여 사용하였다. HPLC 분석은 Waters 2695 및 996 photodiode array detector에 의하여 수행하였다. 刀豆 추출물(CG)과 牛蒡根 추출물(AL) 복합물(CG+AL)은 20 ㎎/㎖로 70% 에탄올에 용해한 후, PVDF syringe filter를 사용하여 여과한 후 분석에 사용하였다. Optima pak C18 column(5 ㎛, 4.6 ㎜ x 250 ㎜)을 사용하여 수행되었으며, 칼럼 온도는 40℃로 유지하였고, 검출은 PDA detector를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(A) 및 0.1% TFA 함유 water(B)를 이용한 gradient system으로 table 1과 같이 최적화하였고, 유속은 1.0 ㎖/min, 주입량은 20 ㎕로 하였다.

Table 1. The solvent eluction condition for HPLC analysis of the 70%(*v/v*) ethanol extract of *C.gladiata* and *Arctium lappa* .

Time(min)	Acetonitrile(A)	0.1% TFA(B)
	10	90
10	10	90
50	50	50
52	100	0
62	100	0
65	10	90
75	10	90

4. 동물 실험 대상

본 연구는 대전대학교의 실험동물윤리 위원회의 승인을 받은 후 규정에 따라 실행하였다(DJUARB2016-031). 수컷 C57BL/6J 쥐 8주령(20-22 g, 8 weeks, Daehan bio, Chungcheongbuk-do, Korea)를 실험 기간 동안 평균 온도 23±2℃, 습도 50±2%로 유지하였으며, 밤낮 주기(12시간 light/12시간 dark, light turn on 9 am)가 조절되는 환경에 수용하였다. 실험 기간 동안 물과 고형사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 제공하였다.

5. 부동화 모델 동물 실험 설계

실험동물은 8주령 C57BL/6J 수컷 마우스에 확립된 조건으로 그룹별로 3마리씩 각각 관리하에 정상군 3마리, 대조군 3마리, 刀豆 70% 주정 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군 3마리, 刀豆 70% 주정 추출물 50 ㎎/㎏ 투여군 3마리, 牛蒡根 70% 주정 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군 3마리, 牛蒡根 70% 주정 추출물 50 ㎎/㎏ 투여군 3마리, 刀豆 70% 주정 추출물과 牛蒡根 70% 주정 추출물을 1:4 비율로 혼합한 복합물(100 ㎎/㎏, 50 ㎎/㎏, 25 ㎎/㎏) 3군 각각 3마리, 총 9군 27마리로 설정하였다. 매일 경구 투여 후 2시간 뒤에 부동화 튜브에 넣어 2시간 동안 고정하여 매일 2시간씩 21일간 부동화 스트레스를 유발한다. 모든 실험이 종료된 후 그다음 날인 22일째에 희생(sacrifice) 시켰다(Fig. 1).

6. 약물 투여 및 부동화 스트레스 부과

약물희석은 0.5% CMC(Carboxymethyl Cellulose, Sigma Aldrich, USA)로 혼탁하여 투여하고, 대조군은 0.5% CMC 용액을 동량 투여하였다. 약물투여는 경구 투여용 금속제 존대(zonde)를 이용하여 위 내로 강제 경구 투여한다. 경구투여 2시간 후 부동화는 구멍이 뚫린 팔콘 튜브에 넣어 2시간 동안 쥐를 고정해 스트레스를 유발하였다.

7. 부검

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

8. 혈청에서 Cortisol, serotonin 생성량 확인

채혈 후 30분 이내에 3,000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하여 −20 ℃ 에 보관하였다가 분석하였다. 마우스의 분리한 혈청에서 스트레스 호르몬인 Cortisol, Serotonin 수준을 enzyme-linked immuno-sorbent assay로 측정하였다. 각각 항체(antibody)를 coating 완충용액(Bio vision, USA)에 희석하여 micro-96well에 coating한 후 4℃에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후에 혈청(10배 희석)을 100 ㎕씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 HRP congugated 항체(Bio vision, USA) 100 ㎕를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 기질을 100㎕씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 ㎕의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader(Emax, Molecular Devices) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 면역형광염색법

마우스의 분리한 뇌 조직을 5% Paraformaldehyde에 담가 고정시키고, 고정된 뇌 조직을 OCT 용액에 넣어 냉동하여 조직을 고정 후 Microtome으로 얇게 박절하여 Slide glass 에 부착 시킨 후 실온에서 건조시켰다. 면역형광조직염색은 슬라이드에 부착시킨 뇌 조직을 immuno-fluorescence staining kit(IF, Thermo Fisher Scientific, USA)방법에 따라 BDNF (H-117, Santa Cruz, Heidelberg, Germany)를 반응시키고 cover glass로 덮어서 고정시켰다. 대조염색으로 핵을 염색할 수 있는 DAPI로 반응시켰다. 형광 BDNF 항체로 염색된 각 단백질을 형광 현미경으로 사진 촬영을 하여 이미지화 하였다. 이를 분석 프로그램을 통해 임의대로 3개 이상의 Hippocampus 구역의 형광감도를 Image J Disclaimer 프로그램(https://imagej.nih.gov/ij/index.html)으로 측정하여 통계처리 하였다.

10. 혈청에서 IgA 생성량 확인

수득한 마우스의 혈청을 micro-96well에 코팅한 후 IgA 항체(R&D system Inc, USA)와 HRP congugated 항체 (R&D system Inc, USA)를 반응시켜 ELISA reader(Emax, Molecular Devices) 기기로 측정하였다.

11. WBC 수 측정

부동화 스트레스 유발 마우스 모델의 혈액을 수득하여 백혈구(WBC)의 수를 서울의과학연구소(Seoul medical science institute, Korea)에 의뢰하여 측정하였다.

12. 면역세포 활성 측정

분리한 면역기관(DLN, MLN, Spleen, thymus)의 세포에서 T cell, B cell, NK cell, macrophage 등 세포의 활성 및 수 변화를 확인하기 위해 각각의 마커가 되는 세포표면 분자(CD4+, CD8+, CD69+, NK1.1+)들에 대한 항체(BD PharMingen, CA)를 반응시킨 후 유세포 형광분석기(FACS)와 Cell Quest software(BD Biosciences, CA)를 통해 면역세포의 활성을 확인하였다.

13. Real-time PCR(RT-PCR)

Total RNA(3-5㎍)를 70℃에서 10분간 열처리하여 변성시킨 후, Reverse transcriptase(MMLV; GI BCO, BRL)와 dNPT, olimer d(T)를 이용하여 제조회사가 제공하는 완충용액과 방법에 따라 37℃에서 60분간 반응하여 cDNA를 제작하였다. 합성된 cDNA(0.1-0.2 volume)에 면역, 염증 관련 유전자의 primer와 2.5mM dNTP, Taq polymerase(0.3U/㎕), 10× 완충용액을 첨가하여 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR system(Applied Biosystems, USA)를 이용해 Real time quantitative PCR을 수행하였다. Real time quantitative PCR의 조건으로는 pre-denaturation은 50℃에서 2 min, 94℃에서 10 min, 그리고 40 cycles을 95℃에서 0.15 min, 60℃에서 1 min 수행하였다.

14. 통계처리

모든 측정 결과는 독립적인 실험에서 도출된 대표 값의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation; SD)로 나타내었다. 각 실험군 결과 값은 Microsoft Office Excel Student's t-test를 사용하여 통계 처리하였으며, $p < 0.05$ 이하의 수준에서 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

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 ㎍/㎖의 농도로 제조하고, CG+AL복합물의 농도는 20 ㎎/㎖로 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 동시 분석조건을 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 ㎎/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 ㎎/㎏ 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(㎎)/체중(g)의 비율로 나타내었다. 심장의 무게는 정상군이 5.05±0.31 ㎎/g body weight인 데 비해 대조군에서는 5.60±0.34 ㎎/g body weigh로 다소 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 실험군에서는 刀豆 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG70% E_100mpk)을 제외한 나머지 투여군에서 정상군보다 낮은 수치를 나타내었으나 통계적인 유의차는 없었다. 비장의 무게는 정상군이 4.17±0.31 ㎎/g body weight이며 부동화 대조군에서는 4.62±2.41 ㎎/g body weigh로 다소 높았으나 통계적인 유의차는 없었다. 모든 실험군에서 비장의 무게는 정상군과 부동화 대조군에 비하여 낮은 수치를 나타내었으나 통계

적인 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.

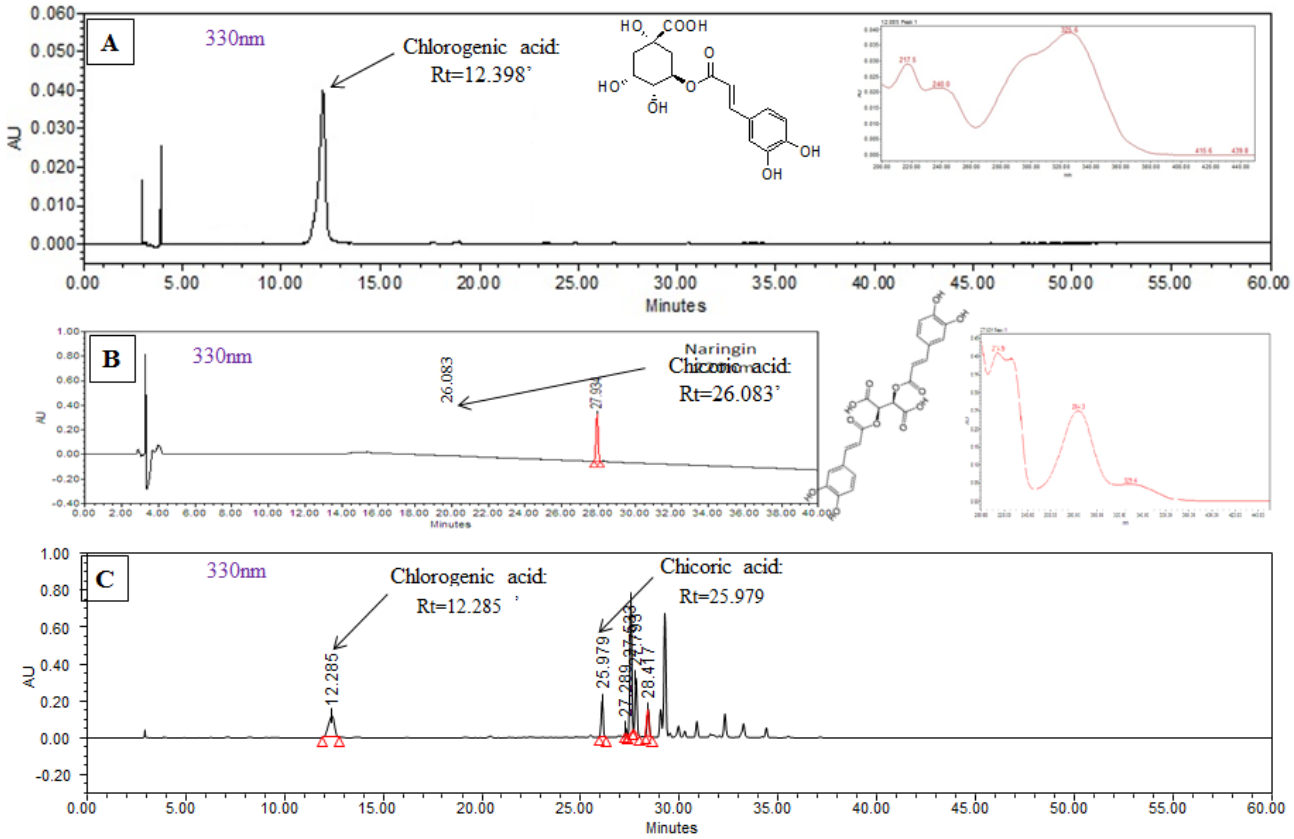

Fig. 1. HPLC chromatograms of Chlorogenic acid standards(A), Chicoric acid standards(B), and the 70%(*v/v*) ethanol extract of *C.gladiata* and *Arctium lappa*(C) at 330 nm. Chlorogenic acid and Chicoric acid were appeared at the retention time of approximately 12.385 min and 26.083 min, respectively.

Table 2. Index components in quality of Chlorogenic acid and Chicoric acid in 70%(*v/v*) ethanol extract of *C.gladiata* and *Arctium lappa*.

	Dosage (㎎/㎖)	Rt (min)	Area	Compound(%)
Chlorogenic acid	0.1	12.398	4,956,683	100
C.gladiata and Arctium lappa. Complex (Chlorogenic acid)	20.0	12.285	22,679,787	1.5252
Chicoric acid	0.1	26.083	4,584,361	100
C.gladiata and Arctium lappa. Complex (Chicoric acid)	20.0	25.979	11,205,617	0.606

Table 3. The body weight gain and organ weight of heart, spleen and thymus in CG or AL and its complexes extract fed mouse.

	C57BL/6J_Nr	IM_S-CTL	IM_S-CG 70%E_100mpk	IM_S-CG 70%E_50mpk	IM_S-AL 70%E_100mpk	IM_S-AL 70%E_50mpk	IM_S-CG+AL (1:4)_100mpk	IM_S-CG+AL (1:4)_50mpk	IM_S-CG+AL (1:4)_25mpk
body weight gain	2.4	-0.6	1.6	1.3	1.2	0.6	1.5	0.8	0.4
Heart	5.05±0.31	5.60±0.34	5.38±0.63	4.59±0.64	4.77±0.96	5.01±0.33	4.35±0.32	4.19±0	4.91±0.33
Spleen	4.17±0.31	4.62±2.41	2.69±0	2.29±0.64	3.18±0.64	3.18±0.64	2.38±0	3.02±0.32	2.34±0.66
Thymus	2.85±0.31	2.92±0	1.79±0	2.52±0.32	2.95±1.60	2.38±0.67	2.29±0.64	2.32±0	1.87±0.66

3. 혈청에서 Cortisol, serotonin 생성량

Fig.2-A는 혈청 중 Cortisol 수준을 측정한 결과로, 刀豆 추출물 100 ㎎/㎏투여군(IM_S-CG70%E_100mpk, $p<0.05$) 그리고 牛蒡根 추출물 50 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-AL70% E_100mpk, $p<0.05$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 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 나타났다(Fig. 2). Fig.2-B는 혈청 중 Serotonin 수준을 측정한 결과로, 刀豆 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG70%E_100mpk, $p<0.05$), 牛蒡根 추출물 50 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-AL70%E_100mpk, $p<0.05$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL (1:4)_100mpk, $p<0.01$)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 50 ㎎/㎏ 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 나타났다(Fig. 2).

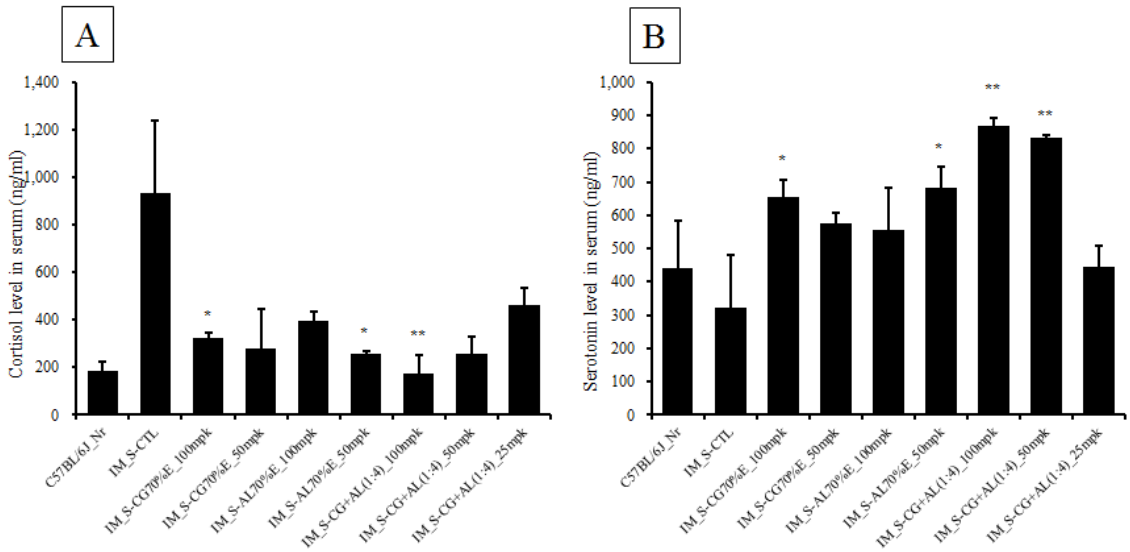

Fig. 2. Effects of CG or AL and its complexes on Serotonin and Cortisol level in serum in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress. C57BL/6J mouse were randomly divided into 9 groups of control, receiving normal saline, receiving CG or AL and its complexes, chronically immobilized(2 h/day immobilization for 21 days). C57BL/6J non-treated group; or(IM_S-CTL) induced with chronic immobilization-stress vehicle group; or the 70%(*v/v*) ethanol extract of *C.gladiata*(IM_S-CG70%E 100 ㎎/㎏ and 50 ㎎/㎏), or the 70%(*v/v*) ethanol extract of Arctium lappa(IM_S-AL70%E 100 mg/kg and 50 ㎎/㎏), or the CG70%E plus AL70%E(1:4 ratio) (IM_S-CG+AL(1:4) 100 ㎎/㎏, 50 ㎎/㎏, and 25 ㎎/㎏). Blood samples were collected using cardiac puncture method and(A) serotonin or(B) cortisol levels were measured by ELISA method. Data are the means±SD of four sections; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$.

4. 뇌 조직의 면역형광염색

마우스 뇌 조직 Hippocampus 부위에서 면역형광염색법으로 뇌의 기억력증진과 스트레스 호르몬을 억제하는 것으로 알려진 BDNF 발현을 확인해본 결과, 정상군에 비하여 스트레스 부동화 대조군(IM_S-CTL)의 BDNF 발현이 현저하게 감소하였다. 刀豆 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG70% E_100 ㎎/㎏)이 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 BDNF 발현이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였고($p<0.05$), 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4) _100mpk, $p<0.01$)과, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 50 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk, $p<0.05$)에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 BDNF 발현이 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3).

5. 혈청에서 IgA 생성량

Fig.4은 혈청 중 IgA 수준을 측정한 결과로, 刀豆 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG70%E_100 ㎎/㎏, $p<0.05$) 그리고 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk, $p<0.01$), 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 50 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk, $p<0.05$)에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 IgA가 증가함을 나타내었다(Fig. 4).

6. 혈액에서 WBC 수 확인

Fig.5는 혈액 중 WBC 수를 측정한 결과로, 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 모든 실험군에서 WBC 수의 증가가 유의성 있게 나타났고, 특히, 牛蒡根 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-AL70%E_100mpk, $p<0.001$) 그리고 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_ 100mpk, $p<0.01$), 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 50 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk, $p<0.05$)이 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 WBC 수가 증가를 나타났다(Fig. 5).

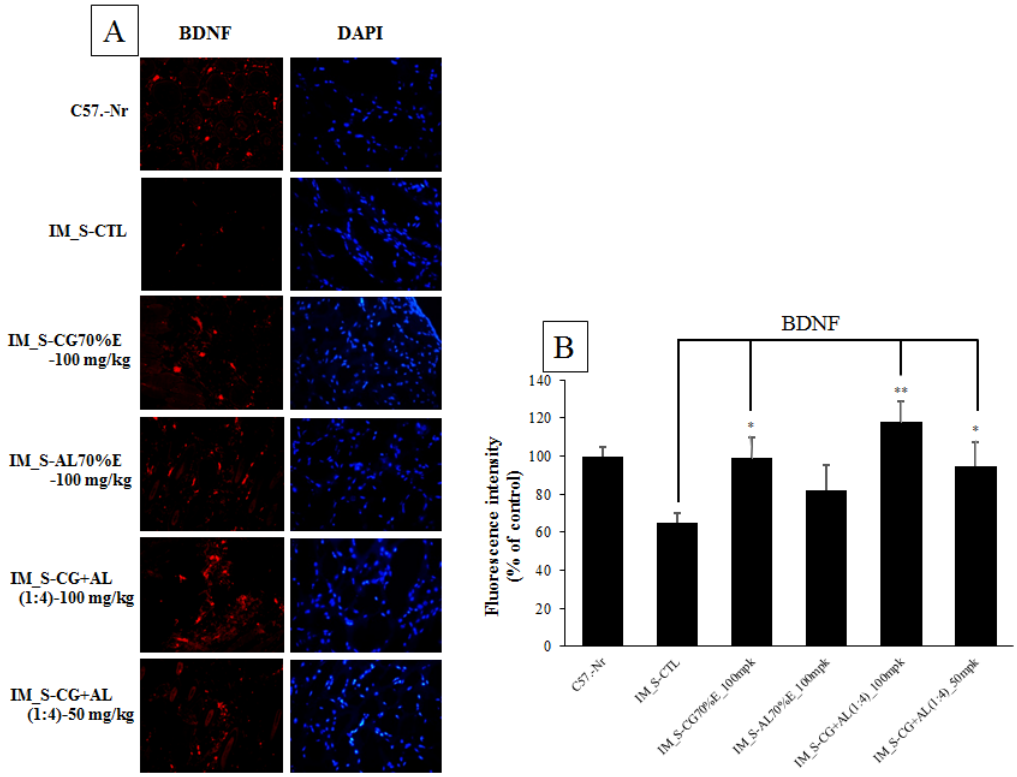

Fig. 3. Effects of CG or AL and its complexes(1:4) on local brain-derived neurotrophic factor(BDNF) protein expression in hippocampus in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress.
(A) Anti-BDNF immunofluorescence(red) in the hippocampus of animals from(C57-Nr) C57BL/6J non-treated group; or(IM_S-CTL) induced with chronic immobilization-stress vehicle group; or the 70%(*v/v*) ethanol extract of *C.gladiata* 100 mg/kg(IM_S-CG70%E 100 mg/kg), or the 70%(*v/v*) ethanol extract of *Arctium lappa* 100 ㎎/kg(IM_S-AL70%E 100 ㎎/kg), or the CG70%E plus AL70%E(1:4 ratio) 100 mg/kg, 50 mg/kg(IM_S-CG+AL(1:4) 100 ㎎/kg, 50 ㎎/kg). Right panels show nuclei DAPI stain from the same sections.(B) Densitometric quantification of BDNF in hippocampus CA3 subregions of animals in the different conditions(n3, each group) in comparison with BDNF fluorescence staining quantified in hippocampus CA3 from control group. Data are the means±SD of four sections; *p < 0.05; **p < 0.01.

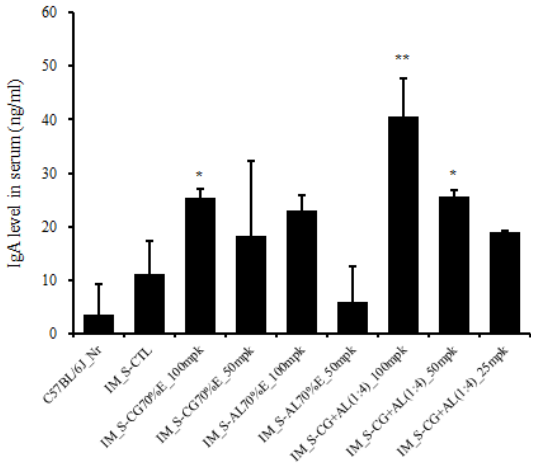

Fig. 4. Effects of CG or AL and its complexes on IgA level in serum in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress.
C57BL/6J mouse were randomly divided into 9 groups of control, receiving normal saline, receiving CG or AL and its complexes, chronically immobilized(2 h/day immobilization for 21 days). C57BL/6J non-treated group; or(IM_S-CTL) induced with chronic immobilization-stress vehicle group; or the 70%(*v/v*) ethanol extract of C.gladiata(IM_S-CG70%E 100 mg/kg and 50 ㎎/kg), or the 70%(*v/v*) ethanol extract of Arctium lappa(IM_S-AL70%E 100 mg/kg and 50 ㎎/kg), or the CG70%E plus AL70%E(1:4 ratio)(IM_S-CG+AL(1:4) 100 ㎎/kg, 50 ㎎/kg, and 25 ㎎/kg). Blood samples were collected using cardiac puncture method and IgA levels were measured by ELISA method. Data are the means±SD of four sections; *p < 0.05; **p < 0.01.

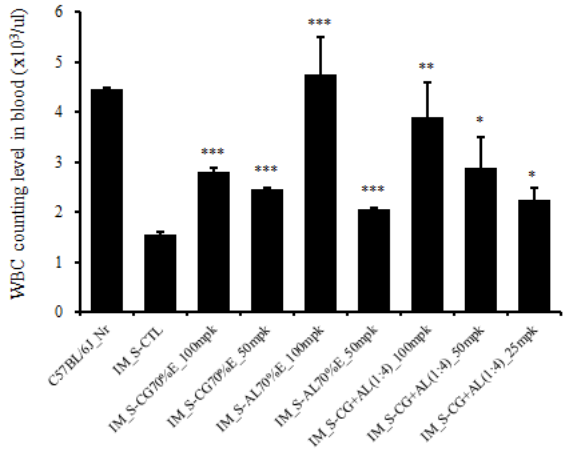

Fig. 5 Effects of CG or AL and its complexes on WBC count number level in serum in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress.
C57BL/6J mouse were randomly divided into 9 groups of control, receiving normal saline, receiving CG or AL and its complexes, chronically immobilized(2 h/day immobilization for 21 days). C57BL/6J non-treated group; or(IM_S-CTL) induced with chronic immobilization-stress vehicle group; or the 70%(*v/v*) ethanol extract of *C.gladiata*(IM_S-CG70%E 100 mg/kg and 50 ㎎/kg), or the 70%(*v/v*) ethanol extract of *Arctium lappa*(IM_S-AL70%E 100 ㎎/kg and 50 ㎎/kg), or the CG70%E plus AL70%E(1:4 ratio)(IM_S-CG+AL(1:4) 100 mg/kg, 50 mg/kg, and 25 mg/kg). Blood samples were collected using cardiac puncture method and WBC count measured by hematology analyzer. Data are the means±SD of four sections; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

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 할 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 ㎎/㎏ 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 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 가장 활성화된 $CD8^+/CD69^+$가 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 3). DLN에서 NK세포 활성은 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 ㎎/㎏ 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 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 B세포 활성이 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 4).

Table 4. Fluorescence activated cell scanning(FACS) analysis in DLN(Draining lymph node) in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress

DLN	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD69^+$	$CD8^+/CD69^+$	$NK1.1^+/CD69^+$	$B220^+/CD69^+$
C57BL/6J_Nr	19.79	44.39	2.32	1.24	0.36	2.23
IM_S-CTL	17.25	30.73	1.69	0.70	0.98	3.60
IM_S-CG70%E_100mpk	31.06	52.33	3.35	2.30	1.60	2.87
IM_S-CG70%E_50mpk	28.70	50.70	2.81	1.28	0.84	2.25
IM_S-AL70%E_100mpk	30.06	42.00	2.38	1.33	0.66	3.43
IM_S-AL70%E_50mpk	31.00	40.64	3.28	1.62	0.86	3.03
IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk	27.09	42.96	3.63	2.94	1.95	4.02
IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk	24.62	45.17	2.44	0.93	1.23	3.32
IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk	20.78	43.55	2.54	1.21	1.14	2.22

2) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 MLN (Mesenteric lymph nodes) 세포에서 면역세포의 활성 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 ㎎/㎏ 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 ㎎/㎏(IM_S-CG70%E_100mpk), 牛蒡根 100 ㎎/㎏(IM_S-AL70%E_100mpk), 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 25 ㎎/㎏ 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 ㎎/㎏ 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 ㎎/㎏(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 ㎎/㎏ 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).

Table 5. Fluorescence activated cell scanning(FACS) analysis in MLN(Mesenteric lymph nodes) in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress

MLN	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD69^+$	$CD8^+/CD69^+$	$NK1.1^+/CD69^+$
C57BL/6J_Nr	9.08	10.57	5.72	5.24	3.02
IM_S-CTL	8.40	13.38	4.69	4.96	3.17
IM_S-CG70%E_100mpk	9.84	8.00	3.31	4.37	3.23
IM_S-CG70%E_50mpk	9.37	9.29	5.22	6.39	4.36
IM_S-AL70%E_100mpk	7.25	7.72	4.08	4.97	3.85
IM_S-AL70%E_50mpk	8.99	10.28	5.77	6.38	2.95
IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk	8.70	10.58	4.70	5.48	2.77
IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk	9.14	11.67	5.41	5.06	2.33
IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk	32.03	19.00	6.70	12.11	1.65

3) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 비장 세포에서 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 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 CD8+가 가장 증가된 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 ㎎/㎏ 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 ㎎/㎏ 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 ㎎/㎏ 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 ㎎/㎏ 투여군에서 $CD11b^+/CD69^+$ 활성 세포 수가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table 6).

Table 6. Fluorescence activated cell scanning(FACS) analysis in Spleen in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress

Spleen	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD69^+$	$CD8^+/CD69^+$	$NK1.1^+/CD69^+$	$NK1.1^+$	$CD11b^+/CD69^+$
C57BL/6J_Nr	9.26	22.26	1.76	1.59	1.79	4.01	5.83
IM_S-CTL	6.32	18.84	1.75	1.22	1.55	2.31	2.12
IM_S-CG70%E_100mpk	14.74	22.47	4.76	4.70	3.42	6.39	4.38
IM_S-CG70%E_50mpk	8.93	27.80	1.91	2.44	2.09	4.87	5.11
IM_S-AL70%E_100mpk	8.91	26.26	1.47	1.49	1.70	5.84	5.61
IM_S-AL70%E_50mpk	11.20	22.42	1.77	2.50	1.72	4.68	4.39
IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk	12.13	34.47	5.50	7.30	4.65	9.26	8.09
IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk	10.60	29.16	3.13	4.74	3.31	6.47	6.47
IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk	10.81	28.31	1.61	1.74	2.48	5.85	5.85

4) 부동화 스트레스 유발 마우스 모델에서 분리한 흉선 세포에서 $CD4^+$ & $CD8^+$ 세포의 활성 및 수 변화

흉선(thymus)에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 $CD4^+$ & $CD8^+$ 세포 수가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 나머지 투여군에서 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 농도 의존적으로 $CD4^+$ & $CD8^+$ 세포 활성이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그중에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군에서 $CD4^+$ & $CD8^+$ 세포 수가 가장 증가 된 것을 확인할 수 있었다(Table. 7).

Table 7. Fluorescence activated cell scanning(FACS) analysis in thymus in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress

Thymus	$CD4^+$	$CD8^+$
C57BL/6J_Nr	8.16	3.92
IM_S-CTL	5.04	1.52
IM_S-CG70%E_100mpk	7.56	3.57
IM_S-CG70%E_50mpk	7.21	4.80
IM_S-AL70%E_100mpk	10.26	4.20
IM_S-AL70%E_50mpk	7.59	3.16
IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk	15.47	6.50
IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk	9.78	5.62
IM_S-CG+AL(1:4)_25mpk	8.34	4.98

5) T cell, B cell, NK cell 등 세포의 활성 및 수 변화

刀豆와 牛蒡根, 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물을 경구투여한 마우스에서 주요 면역기관인 spleen, LN, MLN을 추출하여 세포를 분리한 뒤 CD4(CD4 T cell marker), CD8(CD8 T cell marker), NK1.1 (NK cell marker), CD11b(macrophage marker), CD11c(dendritic cell marker) 항체로 형광 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물을 투여한 마우스 군에서 CD4, CD8 T cell, macrophage, dendritic cell의 수와 활성이 가장 증가 되어있는 것을 확인하였다(Table. 4~7).

8. Quantitative Real Time PCR을 이용한 염증 싸이토카인관련 유전자 발현 확인

비장에서는 정상군에 비해 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 염증 싸이토카인(IL-1beta, IL-6, TNF-α) mRNA 유전자 발현이 증가를 확인할 수 있었고, IL-1beta의 발현은 후보 물질 투여군 중 刀豆 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG_100mpk)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏와 25 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk and 25mpk)에서 통계학적으로 유의성 있게 정상그룹 수준 정도로 회복되는 것을 확인하였다. IL-6의 발현은 후보 물질 투여군 중 牛蒡根 추출물 100 mg/kg 투여군(IM_S-AL70%E_100mpk)과 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 50 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_50mpk)을 제외한 나머지 그룹에서 감소하였지만 통계적 유의성은 볼 수 없었다. 반면 TNF-a의 발현은 후보 물질 투여군 중 刀豆 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG_100mpk)와 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서 통계학적으로 유의성 있게 정상그룹 수준 정도로 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 6).

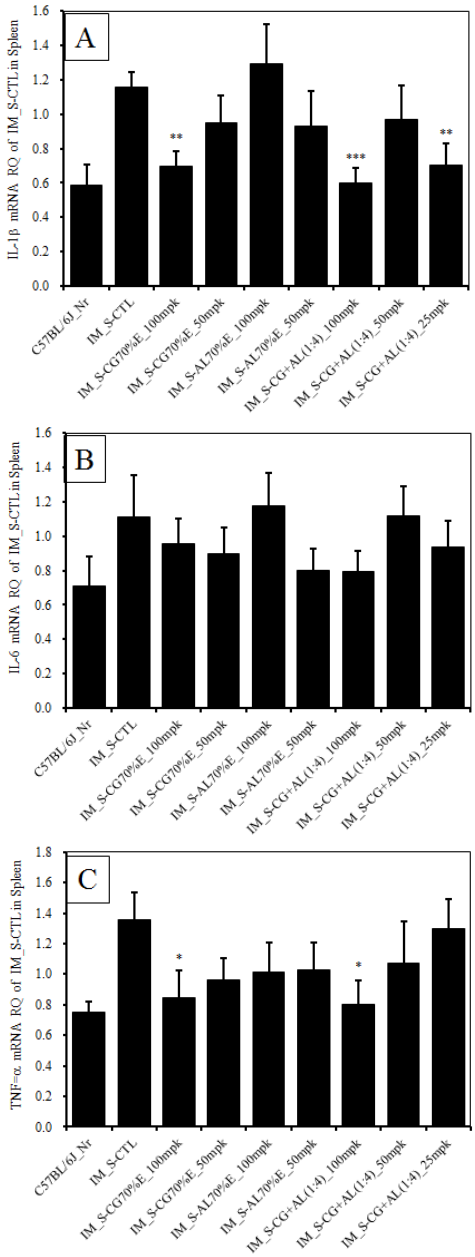

Fig. 6. Effects of CG or AL and its complexes on pro-inflammatory cyokines gene expression in splenocytes in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress.
C57BL/6J mouse were randomly divided into 9 groups of control, receiving normal saline, receiving CG or AL and its complexes, chronically immobilized(2 h/day immobilization for 21 days). C57BL/6J non-treated group; or(IM_S-CTL) induced with chronic immobilization-stress vehicle group; or the 70%(*v/v*) ethanol extract of *C.gladiata* (IM_S-CG70%E 100 mg/kg and 50 ㎎/㎏), or the 70%(*v/v*) ethanol extract of Arctium lappa(IM_S-AL70%E 100 ㎎/㎏ and 50 ㎎/㎏), or the CG70%E plus AL70%E(1:4 ratio)(IM_S-CG+AL(1:4) 100 ㎎/㎏, 50 ㎎/㎏, and 25 mg/kg). Mice spleen were removed and IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA gene expression analysed quantitative real-time PCR at the end of the experiment. Data are the means± SD of four sections; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

9. Quantitative Real Time PCR을 이용한 면역 T세포 활성 싸이토카인관련 유전자 발현 확인

비장에서는 정상군에 비해 부동화를 시킨 부동화 대조군(IM_S-CTL)에서 면역 T세포 활성 싸이토카인(IL-2, IFN-γ, IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 감소를 확인할 수 있었고, 후보 물질 투여군중에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL) 비하여 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 투여 농도 의존적으로 면역 T세포 활성 싸이토카인(IL-2, IL-10, IFN-γ, IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군(IM_S-CG+AL(1:4)_100mpk)에서는 부동화 대조군(IM_S-CTL)에 비해 면역 T세포 활성 싸이토카인(IL-2, IL-10, IFN-γ, IL-12p35/p40) mRNA 유전자 발현이 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

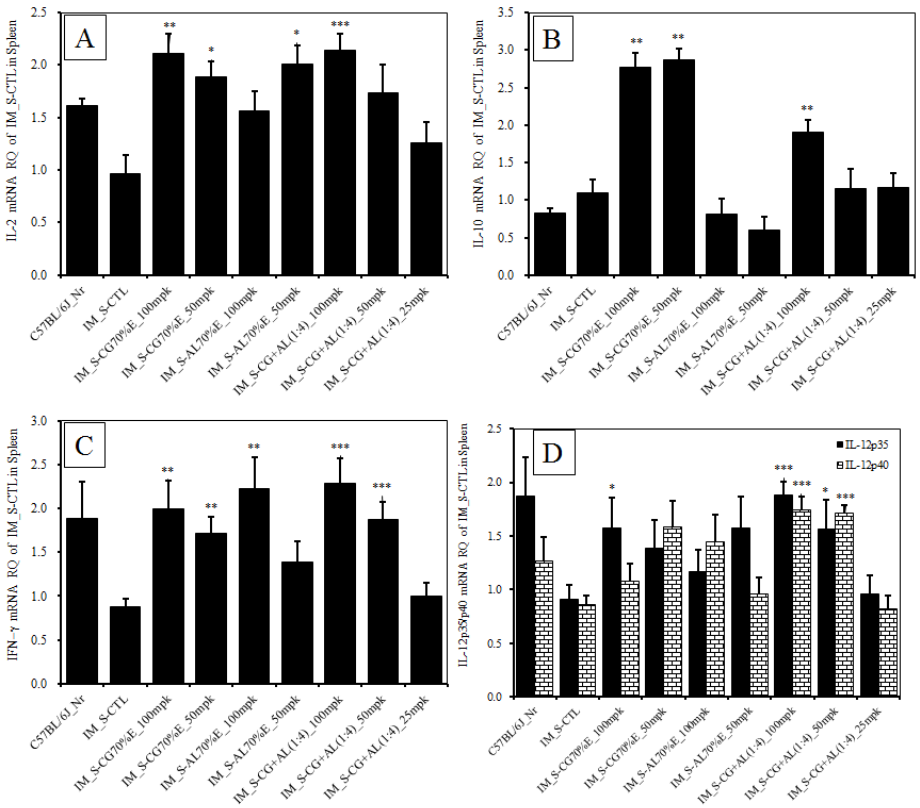

Fig. 7. Effects of CG or AL and its complexes on anti-inflammatory/regulatory cyokine gene expression in splenocytes in C57BL/6J mice after 21 days of chronic immobilization-stress.
C57BL/6J mouse were randomly divided into 9 groups of control, receiving normal saline, receiving CG or AL and its complexes, chronically immobilized(2 h/day immobilization for 21 days). C57BL/6J non-treated group; or(IM_S-CTL) induced with chronic immobilization-stress vehicle group; or the 70%(*v/v*) ethanol extract of *C.gladiata*(IM_S-CG70%E 100 ㎎/㎏ and 50 ㎎/㎏), or the 70%(*v/v*) ethanol extract of *Arctium lappa*(IM_S-AL70%E 100 ㎎/㎏ and 50 ㎎/㎏), or the CG70%E plus AL70%E(1:4 ratio)(IM_S-CG+AL(1:4) 100 ㎎/㎏, 50 ㎎/㎏, and 25 ㎎/㎏). Mice spleen were removed and IL-2, IL-10, IFN-γ and IL-12p35/40 mRNA gene expression analysed quantitative real-time PCR at the end of the experiment. Data are the means±SD of four sections; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

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 보고되었으며[19], 刀豆의 lectins 성분은 면역 감작된 rat에 대한 항염증 효과가 있는 것으로 보고되었으나[20], 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], 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 식품에서 IL-1beta와 TNF-α 생성량을 감소시킨다고 보고했는데[23], 본 연구에서도 刀豆 추출물이 염증성 싸이토카인인 IL-1beta, IL-6, TNF-α를 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 염증싸이토카인(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 ㎎/㎏ 투여군에서 면역 T세포 활성 싸이토카인(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.

Ⅴ. 결 론

본 연구는 스트레스로 인한 면역기능 억제에 따른 질병을 예방하기 위해, 인체에 안전하면서 면역력을 증진시킬 수 있는 식품소재로 刀豆와 牛蒡根을 선정하여, 부동화 스트레스 마우스 모델에 刀豆와 牛蒡根과 刀豆, 牛蒡根 복합물에 의한 스트레스 인자 개선 및 면역력 증진 효과를 연구한 결과는 다음과 같다.

1. 刀豆, 牛蒡根 복합물의 HPLC 지표성분 분석에서 刀豆 유래 Chlorogenic acid와 牛蒡根 유래 Chicoric acid를 동시분석조건으로 설정하였다.

2. 21일간 부동화로 스트레스를 유발한 마우스 모델에서 刀豆와 牛蒡根 투여군중 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군에서 스트레스에 의한 체중감소가 억제되었으며, 스트레스 지표물질인 혈청 중 cortisol농도가 통계학적으로 유의성 있게 억제되었고($p<0.01$), 혈청 중 serotonin($p<0.01$)농도는 현저하게 증가되었으며. 통계학적으로 유의성을 띄었다.

3. 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군이 刀豆와 牛蒡根을 각각 투여했을 때 보다 뇌의 기억력증진과 스트레스 호르몬을 억제하는 것으로 알려진 BDNF 발현이 현저하게 증가되었다.

4. 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군이 刀豆와 牛蒡根을 각각 투여했을 때에 비하여 혈청 중 IgA ($p<0.01$)수치와 혈액 중 WBC 수($p<0.01$)가 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다.

5. 부동화 스트레스유발 마우스 모델에서 분리한 면역기관(DLN, MLN, Spleen, Thymus)에서 유세포형광 염색분석에서 공통적으로 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군이 대조군에 비하여 $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD69^+$, $CD8^+/CD69^+$, $NK1.1^+/CD69^+$등 세포 수 및 활성세포들이 증가를 나타내었고, 특히, NK세포의 활성이 증가되었다. 비장세포에서 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물 100 ㎎/㎏ 투여군에서 대조군에 비해 염증싸이토카인인 IL-1β ($p<0.001$), IL-6, TNF-α ($p<0.05$) mRNA 유전자 발현이 유의성 있게 억제되었으며. 또한 NK세포 활성인자 및 면역 T세포 활성인자인 IL-2, IL-10, IFN-γ, IL-12p35/p40 mRNA유전자 발현이 현저하게 증가되었다.

이러한 결과로 刀豆, 牛蒡根 1:4 복합물은 스트레스 관련 호르몬 억제, 스트레스 억제 관련 인자 개선, 뇌의 기억력증진과 스트레스 호르몬억제 BDNF활성, 면역세포 수 증진, 염증면역 싸이토카인 억제, 면역 활성 싸이토카인 증진 및 NK 세포활성 증진 등을 통하여 탁월한 면역증진 효능을 나타내었다. 따라서 식물 유래 추출물인 刀豆와 牛蒡根 추출물의 스트레스 매개 면역조절능력을 평가하였으며, 刀豆, 牛蒡根 추출물을 혼합하였을 때 나타나는 스트레스 매개 면역조절의 상승효과를 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Orth GK, Moser V, Blom M, Wamala SP, Schenck

GK. Survey of stress in women. Heart disease in Stockholm women is caused by both family-and-work-related stress. Lakartidningen. 1997 ; 632 : 635-638.
2. Joels M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. Nature Reviews Neuroscience. 2009 ; 10(6) : 459-466.
3. Warne JP. Shaping the stress response: interplay of palatable food choices, glucocorticoids, insulin and abdominal obesity. Molecular and Cellular Endocrinology. 2009 ; 300(1-2): 137-146.
4. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. European Journal of Pharmacology. 2008 ; 583(2-3) : 174-185.
5. De Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: From adaptation to disease. Nature Reviews Neuroscience. 2005 ; 6(6) : 463-475.
6. Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Woodson JC, Conrad CD, Bachstetter AD. Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal spinogenesis. Hippocampus. 2006 ; 16(7) : 571-576.
7. Kang MJ, Shin JH. The Effect of Black Garlic Extract on Lipid Metabolism in Restraint Stressed Rats. Namhae Garlic Research Institute. 2012 ; 668-812.
8. Joo SJ, Choi KJ, Kim KS, Lee JW, Park SJ. Characteristics of yougurt prepared with 'Jinpum' bean and sword bean(Canavalia gladiata). Korean J. Postharvest Sci. Technol. 2001 ; 8(3) : 308-312.
9. Cho YS, Bae YI, Shim KH. Chemical components in different parts of Korean sword bean(canavalia gladiata). Korean J. Postharvest Sci. Technol. 1999 ; 6(4) : 475-480.
10. The Health Department and National Chinese Medicine Management Office, Chinese Materia Medica. Shanghai Science Technology Publication. 1998 ; 4 : 385-388. 1998 ; 7 : 653-657.
11. Kim SS, Kim KT, Hong HD. Development of Chunggukjang adding the sword beans. Korea Soybean Digest. 2001 ; 18(2) : 33-50.
12. Jeon KS, Na HJ, Kim YM, Kwon HJ. Antiangiogenic activity of 4-O-methylgallic acid from Canavalia gladiata, dietary legume. Biochem. Biophys. Re.s Commum. 2005 ; 330(4) : 1268-1274.
13. Ekanayake S, Skog K, Asp NG. Canavanine content in sword bean(Canavalia gladiata): Analysis and effect of processing. Food Chem Toxicol. 2007 ; 45 : 797-803.
14. Kim KA. Screening of Antioxidants from Canavalia gladiata DC. Master thesis, KonKuk Univ, Seoul, Korea. 2000; 22: 7-13.
15. Park JH. Seperation and purification of the antifungal antibiotic from Canavalia gladiata. Master thesis, Kangwon National Univ. Chuncheon, Korea. 2005.
16. Nimenibo-Uadia R. Effect of aqueous extract of Canavalia ensiformis seeds on hyperlipidaemia and hyperketonaemia in alloxan-induced diabetic rats. Biokemistri. 2003 ; 15(1) : 7-15.
17. Chan YS, Cheng LN, Wu JH, Chan E, Kwan YW, LeeSM, Chan SW. A review of the pharmacological effects of Arctium lappa. Inflammopharmacology. 2011 ; 19 : 245-254.
18. Nizamutdinova IT, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Jeong YK, Seo HG, Kim HJ. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and preventinflammation in endothelialcells. Food Chem Toxicol. 2009 ; 47 : 2806-2812.
19. Kim OK, Chang JY, Nam DE, Park YK, Jun W, Lee J. Effect of Canavalia gladiata Extract Fermented with Aspergillus oryzae on the Development of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. Int Arch Allergy Immunol. 2015 ; 168(2) : 79-89.
20. Pinto NV, Cavada BS, Brito LF, Pereira RI, da Silva MT, Castro RR, de Freitas Pires A, Assreuy AM. Effects of Canavalia lectins on acute inflammation in sensitized and non-sensitized rats. Inflammation. 2013 ; 36(3) : 713-22.
21. Jung AN, Lee BK, Lee DY, Lee JI, Jung YS. Attenuation Effects of Herbal Mixture Extract on Stress and Sleep Disturbance in Rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2016 ; 45(3) : 313-320.
22. Jeon YJ. Immunomodulatory Activity in Immune Cells from the Yac-Sun Menu. 2014 ; 613(2) : 22.