

한약재 9종의 추출물이 RAW 264.7과 TK-1 세포의 cytokine 분비에 미치는 영향

배수경¹, 조세희², 안태규^{1,2}, 김지인^{3,4}, 김봉현⁵, 임재환^{1,2,3}

¹안동대학교 백신공학과, ²안동대학교 생명과학과, ³안동대학교 백신산업연구소
⁴경북대학교 의과대학 생화학교실, ⁵부부한의원

Modulatory Effects of Herbal Medicines Extracts on Cytokine Release in Immune Response of RAW 264.7 and TK-1

Su-kyoung Bae¹, Se-hee Cho², Tae-kyu Ahn^{1,2}, Jee-in Kim^{3,4}, Bong-hyun Kim⁵, Jae-hwan Lim^{1,2,3}

¹Dept. of Vaccine Biotechnology, Andong National University

²Dept. of Biological Science, Andong National University

³Institute of Vaccine Biotechnology, Andong National University

⁴Dept. of Biochemistry and Cell Biology, School of Medicine, Kyungpook National University

⁵Bubu Oriental Medicine Clinic

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study is to determine the stimulatory effects of herbal medicines extracts on cytokines release of immune response in immune cells, RAW 264.7 and TK-1 cell.

Methods: In a total of 18 extracts, 9 water extracts and 9 ethanol extracts, of herbal medicines, the quantities of polyphenolic compounds were measured and anti-oxidation activities were determined by colorimetric assay. The herbal medicine extracts were treated on RAW 264.7 and TK-1, respectively, and then the releasing changes of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6, and interleukin-10 from both immune cells were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: The polyphenol contents were measured to be 1.56~0.64 mg/g of solids in the two types of extracts with 9 kinds of herbal medicines, while antioxidant activities were found to be 95.62~31.46% as compared with ascorbic acid control. In RAW 264.7 cells treated with herbal medicines extracts, the secretion of TNF- α increased to 1.31~1.18 fold, and the amounts of IL-6 were 68.4~97.9% compared with the control group treated with LPS alone. In particular, the secretion amount of anti-inflammatory cytokine IL-10 was suppressed by treatment using herbal medicine extracts. In the case of TK-1 cells, TNF- α secretion was suppressed according to the concentrations of herbal extract. The released amounts of IL-10 were shown at 10~40 pg/ml, and increased in a dose-dependent manner.

Conclusions: Herbal medicines extracts act on macrophages inducing the secretion of inflammatory cytokine, thereby enhancing the activity of innate immunity. When acting on T cells involved in adaptive immunity, the secretion of anti-inflammatory cytokine is increased to induce the inhibition of the innate immune response.

Key words: herbal medicines, cytokine secretion, RAW 264.7 cell, TK-1 cell

· 투고일: 2018.12.10, 심사일: 2018.12.31, 게재확정일: 2019.01.01

· 교신저자: 임재환 경북 안동시 경동로 1375

안동대학교 생명과학과

TEL: 054-820-5797 FAX: 054-820-7729

E-mail: jhlim@anu.ac.kr

1. 서론

면역반응은 박테리아나 바이러스와 같은 외부 항원에 반응하는 방어 기작이다. 면역 세포는 다양

한 사이토카인을 분비하여 보체 시스템을 활성화시키고 선천성 면역반응을 유도한다. 또한, 염증성 사이토카인이 분비되면 간에서 작용하여 다양한 급성 단계 단백질(acute phase proteins)의 합성, 분비를 유도하고, 또한 내인성 발열 물질으로도 작용한다¹. 과도한 염증 반응은 오히려 질병을 유발하므로 정교하게 조절되어야 하는 필요에 의해서 세포에서 분비되는 항염증성 사이토카인은 과도한 염증 반응을 억제하는 역할을 한다². 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α , TNF- α)는 대식세포 등에서 주로 생성되는 사이토카인으로, 염증 반응을 유도하며 stem cell에 영향을 주어 조절 작용을 활성화시킨다. TNF- α 는 TNFR 수용체에 결합하여 작용하며, 전사조절인자인 AP-1와 NF- κ B를 활성화시켜 염증 반응과 면역기능에 관련된 유전자 발현을 유도한다^{3,4}. Interleukin-6(IL-6)는 염증성 사이토카인으로 주로 대식세포에서 JAK/STAT 신호 전달 경로를 통하여 분비되며 급성면역반응 및 염증 반응을 유도하고, B lymphocyte의 성장 및 분화를 유도하고 항체 생성을 유도한다^{5,6}. 또한 근육세포에서 분비되는 IL-6의 경우는 마이오카인(myokine)과 같이 항염증 사이토카인으로 기능하기도 한다⁷. Interleukin-10(IL-10)는 T lymphocyte에서 주로 분비되는 사이토카인이며, B lymphocyte, 비만세포 등에서도 분비된다. IL-10 역시 JAK/STAT 신호 전달 경로를 통해 작용하며, 항염증성 사이토카인으로서 염증 반응에 관여하는 사이토카인을 억제하거나 B lymphocyte의 성장 및 분화를 유도하여 항체 생산을 유도한다⁸.

면역반응을 강화하고 유지하게 하는 면역증강제(Adjuvant)는 백신의 면역원성을 높일 수 있고 항암치료에도 이용되는 기술이기에 관심이 증가하고 있다⁹. 1926년 Glenny가 개발한 알루미늄 복합체(alum)는 지금까지 가장 광범위하게 사용되고 있는 면역보조제로서 그 안정성은 입증되었으나 낮은 항체 활성 강화 효과와 세포성 면역반응을 활성화시키지 못한다는 단점 등으로 새로운 면역증

강제가 요구되어지고 있다¹⁰. 알루미늄, 칼슘 같은 무기염류 뿐 아니라 마이크로박테리아, 그람 음성 균 내 독소 및 muramyl dipeptide(MDP)를 포함한 세균이나 그 파생물을 이용한 많은 면역 보조제가 연구개발 된 바 있으나, 이 역시 자체의 독성 및 부작용, 비용 등과 같은 문제로 임상적으로 사용되지 않고 있다^{11,12}. 한약재를 포함한 천연물질은 인체에서 다양한 면역 세포를 활성화시켜 사이토카인의 합성, 분비를 유도할 수 있는 면역조절 신호 전달 물질로서 면역증강 기능을 가지는 인자로 연구 개발되어왔다¹³. 예를 들어, 식물성 면역보조제인 사포닌, 인삼 다당류인 ginsan 및 표고버섯 다당류인 렌티난 등이 대표적이다^{14,15}. 화학 물질에 비해 부작용이 적고 면역 기능에 영향을 미치는 천연물질의 대부분은 병원체의 직접적인 공격 없이도 B 림프구를 활성화시키고, 항체 생성을 증가하며, 대식세포의 활성화 및 다양한 사이토카인의 분비 유도를 통해 숙주의 면역 기능을 강화시켜준다¹⁶. 따라서 한약재의 효능에 관한 연구는 면역 증진제로서 면역반응의 강화와 면역 관련 질환의 치료에 활용될 것으로 기대되고 있다¹⁷. 하지만 한약재 및 면역 기능에 관한 대부분의 연구는 대식세포 면역에 대한 한방식물 추출물의 효능 연구가 주로 진행되고 있다. 본 연구에서는 면역력의 강화에 도움이 되는 것으로 알려진 9종의 한약재 추출물의 처리에 따라 면역세포에서 분비되는 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6, 그리고 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생성에 어떤 영향을 미치는지에 대하여 ELISA 분석을 수행하여 면역 활성 강화 효능을 제시하고자 한다. 결과적으로 부작용이 많은 면역증강제를 대체하기 위해 연구에 이용된 천연 한약재 추출물이 면역증강제로써 이용 가능한지를 제시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에 사용한 한약재는 한의학에서 면역력

을 강화시켜주는 것으로 알려져 있고 경북지역에서 주로 생산되는 약용작물 중에서 총 9가지(산약, 당귀, 구기자, 감초, 산수유, 백출, 마가목, 오미자, 황기)를 선정하여 동우당제약(Yeongcheon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 선정된 9가지 건조 한약재 시료 10 g에 10배 부피의 증류수와 에탄올을 가하여 각각 90 °C 및 25 °C에서 10시간 동안 교반 후

원심 분리하여 얻은 상등액을 여과한 후 Speed-Vac (EYELA, Japan)을 이용해 25,000 ppm으로 농축한 후 각각을 열수 추출물(WEX)과 에탄올 추출물(EEX)로 정의하고 각 추출물을 다음 실험에 사용하였다. 각 한약재의 원산지과 추출 총량은 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Types of Herbal Medicine Used in This Study

Korean name	Scientific name	Total amounts of WEX (ppm)	Total amounts of EEX (ppm)	Origin
Omiija	<i>Schisandra chinensis</i> (Sc)	560,439.56	627,078.38	Gyungbuk
Sanyak	<i>Dioscorea batatas</i> (Db)	548,387.1	350,117.10	Gyungbuk
Gamcho	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (Gu)	558,764.94	553,488.37	China
Danggui	<i>Angelica gigas</i> (Ag)	460,255.15	977,881.26	Gyungbuk
Gugija	<i>Lycium chinense</i> (Lc)	754,178.96	1,068,524.97	Chungnam
Hwanggi	<i>Astragalus membranaceus</i> (Am)	612,500.00	444,444.45	Gyungbuk
Magamog	<i>Sorbus commixta</i> (Sco)	72,653.89	44,705.88	Gyungbuk
Baekchul	<i>Atractylodes macrocephala</i> (Ama)	759,643.92	321,176.47	Gyungbuk
Sansuyu	<i>Cornus officinalis</i> (Co)	1,107,601.20	1,340,326.34	Jeonnam

2. 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량측정에 사용된 실험방법으로 페놀성 물질의 일반적인 산화환원 성질을 이용하여 페놀성 물질이 환원된 결과로 나타나는 몰리브덴을 측정하는 Folin-Ciocalteu 시험법을 사용하였다. 500 ppm의 한약재 추출물 10 µl에 2% Na₂CO₃ 용액 200 µl를 가한 후 3분간 둔 후 50% Folin reagent(Sigma-Aldrich, USA) 10 µl를 추가로 처리하고 30분 후 반응액의 흡광도를 Micro-reader를 사용하여 760 nm의 파장에서 측정하였다. 표준물질로는 Gallic acid를 사용하여 한약재 추출물과 동일한 방법으로 실험 진행 후, 검정곡선을 작성하여 3회 반복을 하여 한약재의 함량 분석에 사용하였다.

3. 항산화 활성 분석

7 mM ABTS[(2,2-azino-bis(3-rthylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Wako, Japan)와 potassium persulfate

(Sigma-Aldrich, USA)를 최종농도로 혼합하여 실온의 암소에서 15시간 동안 반응시킨 후 734 nm에서 O.D값이 0.6±0.1이 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 ABTS radical 용액 150 µl에 샘플을 농도별로 50 µl를 넣어 혼합 후 5분 후에 측정하였다. 대조군으로 ascorbic acid(Sigma-Aldrich, USA) 10, 25, 50, 100 ppm을 사용하여 표준곡선을 구하고 실험군은 산약, 당귀, 구기자, 감초, 산수유, 백출, 마가목, 오미자, 황기 총 9개의 시료의 열수 추출물, 에탄올 추출물 각각 100, 500, 1000 ppm으로 처리한 후 반응시켜 항산화 활성 효능을 구하였다.

Inhibition (%) = [1 - (시료 처리구 흡광도 - blank 흡광도) / 무처리구 흡광도] × 100

4. 세포배양 및 추출물 처리

본 연구에 사용된 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank

[KCLB], Korea)에서, T 세포주인 TK-1(CRL 2396) 세포는 미국 세포주 은행(American Type Culture Collection [ATCC], USA)에서 분양받았다. RAW 264.7 세포는 DMEM(Lonza, Switzerland), TK-1 세포는 RPMI 1640(Welgene, Korea) 배지에 10% FBS(Gibco, USA)와 1% antibiotics(Gibco, USA)를 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 60 mm 배양접시에 1.0×10⁶ cell을 seeding 하였고 24시간 배양 후, RAW 264.7 세포는 LPS(1 ng/ml)와 한약재 추출물을, TK-1 세포는 한약재 추출물을 25 ppm, 100 ppm이 되도록 각각 처리한 후 24시간 동안 지속 배양하였다.

5. Cell viability test

한약재 추출물 처리에 의한 세포생존율은 MTT assay 방법을 사용하여 농도별 세포독성을 측정하였다. 96 well plate에 2.5×10⁴ cell/well이 되도록 분주한 후 24시간 배양 후 LPS(1 ng/ml)와 한약재 추출물을 25 ppm, 100 ppm 농도로 처리하였다. 한약재 추출물을 처리하고 24시간 배양 후, MTT (5 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)를 각 well 당 10 µl 가하고 4시간 추가 배양하였다. 그 후, 상등액을 제거하고 각 well 당 0.1 N HCl을 첨가한 isopropanol 100 µl을 분주하여 Microplate reader(Infinite® 200, Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Cytokine의 정량 분석

한약재 추출물 처리에 의한 cytokine, TNF-α, IL-6, IL-10, 생성 유도 효능을 분석하기 위하여, RAW 264.7 대식세포주에 LPS(1 ng/ml)와 한약재 9종의 WEX, EEX를 각각 25 ppm, 100 ppm으로 처리하고, TK-1 세포는 한약재 추출물 25 ppm, 100 ppm으로 처리하여 24시간 배양 후 각 세포배양 상등액을 모아서 원심분리한 후 각각의 ELISA kit(Abcam, UK)를 이용하여 측정하였다. Primary capture antibody가 코팅된 96 well plate에 standard

와 시료를 넣어 반응시킨 후 세척 후 biotinylated antibody와 추가로 반응시킨다. 추후 streptavidin-HRP conjugate와 반응시킨 후 substrate solution으로 실온에서 발색시킨 후 Microplate reader(Infinite® 200, Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 제공된 각 TNF-α, IL-6, IL-10(5,000 pg/ml) 표준용액을 희석하여 얻은 흡광도 값으로 표준 곡선을 구하고 각각의 생성된 cytokine의 농도를 비교 산출하였다.

7. 통계처리

본 실험에서 측정된 분석결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험군간의 통계학적 분석은 analysis of variance(ANOVA) 분석을 실시하였고, Tukey's multiple range test로 p<0.05 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 한약재 추출물의 총 폴리페놀 함량

열수 및 에탄올 추출물 내 식물의 2차 대사산물인 폴리페놀 화합물의 총 함량을 확인하기 위하여 본 실험에서는 한약재 9종 추출물의 고형분 농도를 500 ppm으로 맞춘 후 gallic acid를 기준물질로 하여 측정된 결과 마가목(Sco)의 열수와 에탄올 추출물이 각각 1.56±0.30과 1.48±0.22 mg/ml로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Table 2). 오미자(Sc)의 경우 열수와 에탄올 추출물 내에 각각 0.64±0.22와 0.64±0.18 mg/ml로 폴리페놀 함량이 가장 낮게 나타났다. 나머지 한약재 7종의 WEX 내에 폴리페놀 함량은 0.84±0.36~1.02±0.44 mg/ml, EEX 내에 폴리페놀 함량은 0.74±0.26~1.02±0.34 mg/ml로 측정되었다.

2. 한약재 추출물의 항산화 활성

한약재 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 ascorbic acid 500 ppm으로 처리한 대조군과 비

교하여 한약재 WEX 및 EEX 500 pp으로 처리한 후 소재별 ABTS 라디컬 소거 효능을 상대적으로 비교하였다. 마가목(Sco) WEX는 95.62±0.95%, 산수유(Co) WEX는 78.26±2.26%, 구기자(Lc) WEX는 53.34±1.00%의 라디컬 소거효능을 나타냈다(Table 2). 한약재 EEX의 경우 대조군의 라디컬 소거 활성을 비교하였을 때 마가목 추출물은 90.33±1.82%, 산수유

추출물은 78.44±3.94%, 감초(Gu) 추출물은 67.27±3.10% 순으로 소거 효능을 나타냈다. 결과적으로 한약재 추출물 중 마가목, 산수유, 구기자의 항산화 효능이 가장 높게 나타났으며 추출 방법에 따라서는 열수 추출에 비하여 에탄올 추출물의 라디컬 소거 효능이 높은 것을 확인하였다.

Table 2. Total Contents of Polyphenolic Compounds and ABTS Radical Scavenging Activity

Herbal medicine	Total contents of Polyphenolic compounds* (mg/g of solid)		ABTS scavenging activity† (%)	
	WEX	EEX	WEX	EEX
Magamog	1.56±0.30	1.48±0.22	95.62±0.95 ^f	90.33±1.82 ^e
Sansuyu	1.02±0.44	1.02±0.22	78.26±2.26 ^e	78.44±3.94 ^{de}
Sanyak	1.02±0.26	0.96±0.36	31.46±8.34 ^{bc}	45.41±3.18 ^{bc}
Gugija	0.98±0.28	1.02±0.34	53.34±1.00 ^d	52.02±2.39 ^c
Hwanggi	0.94±0.32	0.78±0.28	25.03±4.06 ^{abc}	39.96±7.08 ^{bc}
Gamcho	0.94±0.40	0.80±0.40	28.51±8.99 ^{abc}	67.27±3.10 ^d
Baekchul	0.88±0.38	0.86±0.32	16.23±3.81 ^a	37.39±7.89 ^b
Danggui	0.84±0.36	0.74±0.26	17.65±2.65 ^{ab}	19.91±3.58 ^a
Omiija	0.64±0.22	0.64±0.18	33.21±5.60 ^c	47.23±1.86 ^{bc}

* Numerical values are mean±SD of triplicate determinations.

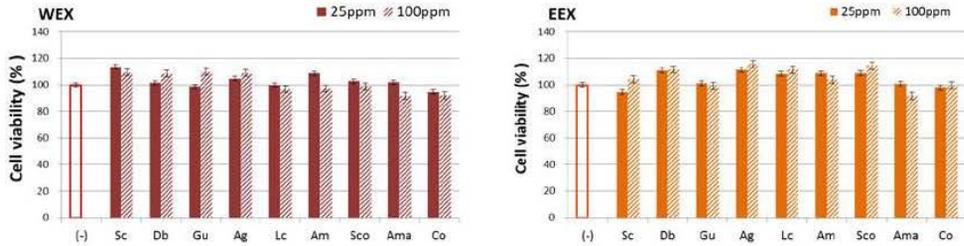
† Different superscript letters in the same column indicate significant differences at the p<0.05 by one-way anova and Tukey HSD multiple range test.

3. 한약재 추출물 처리에 따른 세포 생존율

한약재 추출물 처리에 따른 RAW 264.7 세포 생존율을 조사하기 위하여 LPS(1 ng/ml)와 25 ppm, 100 ppm 농도로 천연 한약재 9종의 열수 및 에탄올 추출물을 각각 처리한 후 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1A). 한약재 WEX의 경우 추출물을 처리하지 않은 대조군과 상대적으로 비교할 때 100 ppm 처리군의 생존율이 91.6~109.9%까지로 나타났다. EEX의 경우에는 오미자(Sc), 백출(Ama) 추출물의 100 ppm 처리군에서 각각 94.6, 100.9%, 나머지 추출물 처리군에서는 105.7±8%의 세포 생존율을 나타냈다. 따라서 대부분의 한약재 추출물 처리군이 91.6~114.4%의 세포 생존율을 나타내어 세포독

성이 거의 없음을 확인하였다. 마찬가지로 한약재 추출물 처리에 따른 TK-1의 세포 생존율을 확인하였다. 모든 추출물의 처리군에서 세포 생존율이 81.4~119.0%으로 나타났으며, 특히 당귀, 산약, 구기자, 마가목의 WEX 100 ppm 처리군에서 각각 106.9, 102.1, 103.8%의 생존율을 보였다. 당귀 EEX 100 ppm으로 처리한 경우 114.7%, 나머지 한약재의 EEX 100 ppm 처리군에서 90.6~110.7%로 확인하였다. 이후 실험에서 대식세포와 림프구 세포주에 세포독성의 영향이 크지 않은 9종의 한약재 WEX, EEX의 25 ppm과 100 ppm으로 처리하여 사이토카인 생성 유도 효능을 확인하였다.

A



B

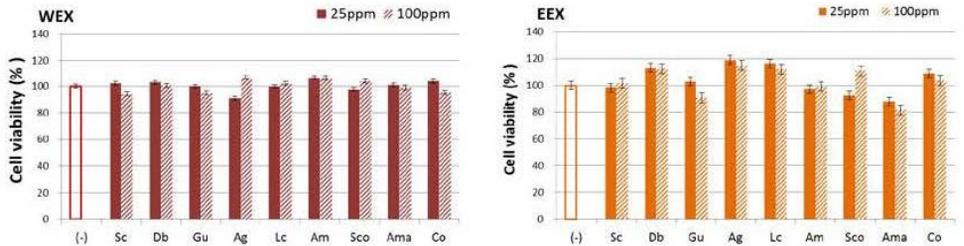


Fig. 1. Cell viability of RAW 264.7 against herbal medicines WEX and EEX.

RAW 264.7 and TK-1 cells were grown in separate 96 well plates and treated with different concentration of herbal medicines water extracts (WEX) and 70% ethanol extracts (EEX), respectively. After incubation for 24 hours, MTT assay was performed with Materials and Methods. All data are mean of triplicated independent reactions Abbreviated letters indicate each medicinal plant respectively, in Table 1.

4. 한약재 추출물을 처리한 RAW 264.7 세포 내 Cytokine 발현

한약재 WEX 및 EEX 처리에 따른 RAW 264.7 세포의 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6 분비량, 항염증성 사이토카인 IL-10 생성량을 조사하기 위하여 LPS(1 ng/ml)와 25 ppm, 100 ppm 농도로 한약재 9종의 WEX과 EEX를 각각 처리한 후 ELISA assay로 분석하였다. LPS(1 ng/ml)만 처리한 양성 대조군과 LPS 및 추출물 모두를 처리하지 않은 음성 대조군을 설정하고 한약재 실험군과 상호 비교하였다(Fig. 2). TNF- α 와 IL-6는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 대표적인 염증성 사이토카인으로 초기 염증 반응에서 세포 간의 신호전달을 수행하여 면역반응에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. 또한 T 림프구에서 주로 분비되는 사이토

카인 IL-10은 항염증성 사이토카인으로 염증 반응에 관여하는 사이토카인을 간접적으로 억제하거나 B lymphocyte의 성장 및 분화를 유도하는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서는 LPS 처리 및 한약재 처리를 통해 유도된 RAW 264.7 세포주로부터 분비된 각 사이토카인의 양을 측정하여 대식세포의 면역증강 또는 억제 영향에 대한 지표로 제시하고자 하였다¹⁸.

1) TNF- α 분비량 정량 분석

한약재 추출물을 처리하였을 경우, 대조군인 LPS (1 ng/ml)만 처리했을 때의 생성, 분비량(10.4 ng/ml)보다 높은 농도의 사이토카인 TNF- α 의 생산 및 분비가 유도되는 것을 확인하였다. 한약재 WEX 100 ppm 농도로 처리 시 1.31 ± 0.16 배의 TNF- α 가 분비되었으며 EEX 100 ppm을 처리한 RAW 264.7

세포군에서 TNF- α 분비량이 1.18 ± 0.12 배로 나타나는 것을 확인하였다. 특히, 마가목(Sc)과 산수유(Co)의 WEX와 산수유 EEX 처리 시 TNF- α 생성 및 분비량은 LPS 처리군과 비교하여 각각 1.51, 1.55, 1.32 배로 가장 높게 유도되었다(Fig. 2A). 또한 대식세포에 한약재 WEX의 처리 시에는 염증성 사이토카인 TNF- α 의 분비가 농도 의존적으로 증가하였다. 이는 RAW 264.7 세포에 생약복합물 처리 시 TNF- α 의 생성량이 유의적으로 증가하고, 마우스에서 분리한 대식세포에 한방복합처방제의 농도별 처리 시 TNF- α 의 생성이 증가한다는 결과와 일치한다^{19,20}. 일반적으로 한방 소재의 처리에 의해 대조군인 LPS 처리군에 비하여 TNF- α 의 발현이 작은 상승효과는 면역 활성화에 긍정적인 영향을 주지만, TNF- α 의 과발현은 염증을 과도하게 유발하여 감염상태를 더욱 악화시킬 수도 있다²¹. 이러한 관점에서 최근 참치유 또는 한방 복합처방제의 대식세포 처리 시 LPS에 의한 TNF- α 의 분비 억제를 통하여 TNF- α 의 과발현에 의한 염증 억제 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다^{22,23}. 결과적으로 본 연구 결과는 위의 한방소재 복합물 및 추출물 처리에 따른 TNF- α 생성이 농도 의존적으로 증가한다는 보고와 일치하는 결과로 염증성 사이토카인 TNF- α 의 분비 증가로 1차 면역반응 유도를 촉진하고 이를 통하여 T 림프구의 증식 및 활성화에 기여함으로써 면역 활성화 강화 효과를 보이는 것으로 판단된다.

2) IL-6 분비량 정량 분석

LPS(1 ng/ml)만 처리했을 때 IL-6는 466.3 pg/ml 농도로 분비되었으며 한약재 추출물, WEX, EEX를 처리하였을 경우 대부분 분비가 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2B). RAW 264.7 세포주에 황기(Am)와 백출(Ama)을 제외한 한약재 WEX를 100 ppm으로 처리했을 때 IL-6의 분비량이 25 ppm 처리 시에 비해 증가했으나, 모든 한약재 EEX 처리 시에 농도 의존적으로 분비량이 감소하였다. 특히, 산약(Db)와 구기자(Lc) WEX의 경우 25 ppm과

100 ppm 조건으로 처리 시에 IL-6의 분비량은 LPS 처리 시 분비량과 비교하여 각각 71.4%, 76.9%와 97.9%와 95.4%로 추출물 처리 농도에 따른 큰 차이를 보였으며, 오미자(Sc) WEX와 오미자, 백출, 산수유(Co) EEX 처리 시에 IL-6의 분비량은 각각 68.4%, 74.9%, 68.0%, 68.2%로 가장 큰 분비량 억제 효능을 보였다. 염증성 사이토카인 IL-6의 생성 및 분비 활성을 유의하게 억제하는 것은 대식세포의 과도한 염증 반응 유도로 인해 유발되는 류마티스성 관절염, 급성 호흡기질환 등 염증성 질환을 완화할 수 있는 것으로 보고된 바 있다²¹. 결과적으로, 대식세포에서 염증성 사이토카인 IL-6는 TNF- α 와 반대로 한약재 추출물 처리 시에 그 생성 및 분비 활성이 일부 억제되어 염증성 질환을 억제할 것으로 여겨진다.

3) IL-10 분비량 정량 분석

대식세포에 LPS 처리에 따른 사이토카인 TNF- α 의 분비 증가량에 비하여 항염증성 사이토카인 IL-10의 분비량은 매우 낮았으며 한약재 추출물을 처리하였을 경우 LPS 처리군에 비하여 WEX 처리의 경우 51.3~235.2%, EEX 처리의 경우 47.0~166.4%로 나타났다(Fig. 2C). 복강대식세포에 lemongrass 추출물을 5, 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ 농도로 처리 시에 IL-10의 분비량은 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하였으며, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도로 각각 처리한 결과 IL-10 생성을 억제되었고, LPS 처리 후 lemongrass 추출물을 처리 시에도 IL-10의 생성이 감소되었다고 보고된 바 있다²⁴. 한약재 중 산약(Db), 감초(Gu), 당귀(Ag), 구기자(Lc) WEX 25 ppm 처리 시에 IL-10 분비량은 대조군과 상대적으로 138.0%, 235.2%, 229.6%, 214.6%로 증가하고, 당귀(Ag), 황기(Am) EEX 처리 시 각각 121.0%, 166.4%로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2C). 대부분의 한약재 추출물에서 구기자 EEX 처리의 경우를 제외하고 25 ppm 처리 시 보다 100 ppm 처리 시에 IL-10 분비량이 상대적으로 감소하였다. 또한 한약재 중 황기(Am), 마가목(Sc), 백출(Ama), 산수유(Co) WEX

처리의 경우는 LPS 만을 처리한 대조군과 비교하여 상대적으로 낮은 분비량이 나타났고, 당귀와 백출을 제외한 나머지 한약재 EEX의 처리 경우 역시 대조군에 비해 낮은 IL-10 분비량을 보였다. 결과적으로 대식세포에서 한약재 WEX, EEX를 처리할 경우 예상대로 항염증성 사이토카인 IL-10는 다른 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6에 비하여 상대적으로 매

우 낮은 농도로 분비되었으며, 한약재에 따라 분비 유도량이 증가 또는 억제하고 있는 것으로 확인되었다. 결과적으로 한약재 추출물(산약, 감초, 당귀, 황기)의 처리에 의하여 IL-10의 생성, 분비가 증가 되었으며, 이를 통하여 염증 반응 유도를 억제하고 최종적으로 적응면역의 주 관여 면역세포인 B, T 림프구의 면역 활성을 강화시키는 것으로 판단된다.

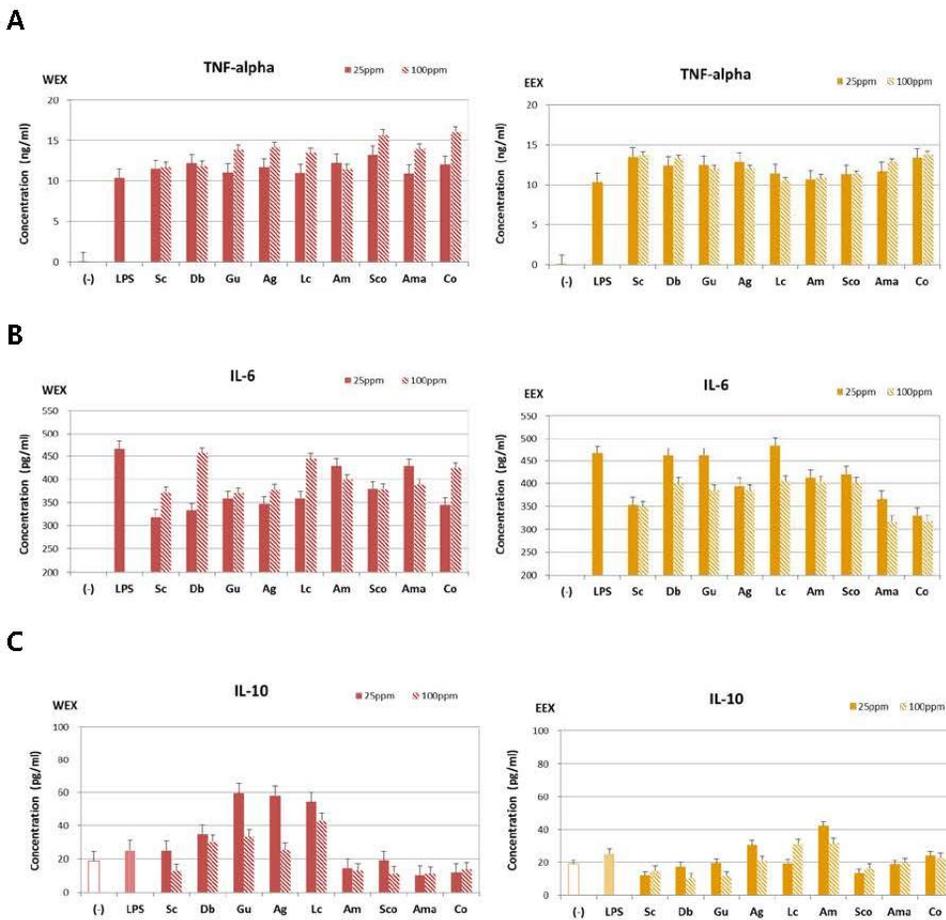


Fig. 2. Relative concentrations of cytokines, TNF- α , IL-6, IL-10, released from RAW 264.7 by treatment with herbal medicines, WEX and EEX.

RAW 264.7 (1×10^6 cells) was cultured in a 60 mm culture dish and treated with LPS (1 ng/ml) and two different concentrations of herbal medicine extracts, WEX and EEX, respectively. After incubation for 24 hours, ELISA assays were performed with indicated specific antibodies coated on the commercial ELISA plates in materials and methods. All data are mean of triplicated independent reactions. Abbreviated letters indicate each medicinal plant respectively, in Table 1.

5. TK-1 세포의 cytokine 분비에 미치는 영향

T 림프구의 활성화에 의한 면역조절 작용은 T helper type 1(Th1) 세포와 T helper type 2(Th2) 세포의 균형에 의해 이루어진다. Th1 세포는 세포 매개성 면역에 작용하여 국소적 염증작용에 관여하며 cytokine IL-2, TNF- α 등의 분비에 의해 활성화되고, Th2 세포는 항체에 의한 체액성 면역에 작용하여 IL-6, IL-10 등의 분비에 의해 작용한다²⁵. IL-10은 Th2 세포에서 유도되는 사이토카인으로 알려졌으나 최근 연구에서는 T, B 세포뿐만 아니라 내재면역에서 작용하는 대식세포, 수지상세포와 자연살해세포 등 많은 세포에서 분비되는 것으로 알려져 있다⁸. 또한 CD8 T 세포는 IL-4가 존재하는 조건에서 IL-10 생산 및 분비하는 Treg 세포의 형질을 나타낼 수 있다²⁶. 본 실험에서는 9가지 천연 한약재 추출물 처리에 따른 TK-1 세포의 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 생성, 분비 및 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생성 분비량을 조사하고자 하였다. 이를 위하여 한약재 WEX와 EEX를 25 ppm, 100 ppm 농도로 각각 처리한 후 ELISA assay를 수행하여 무처리 대조군과 비교하여 사이토카인의 생성 및 분비 유도 효능을 분석하였다(Fig. 3).

1) TNF- α 분비량 정량 분석

TNF- α 는 Th1 세포 등에서 분비되는 염증성 사이토카인으로 T 림프구와 상호 작용하여 T 림프구의 활성화와 성장을 조절하며 암세포의 세포 용해를 유도함으로써 직접적으로 항암 작용을 나타내며, 반대로 TNF- α 의 분비가 지나치게 높을 경우 염증 및 면역반응에 관여하여 질병의 상태를 더욱 악화시킬 수 있다^{27,28}. 본 실험에서는 한약재 추출물을 처리한 TK-1 세포에서 분비되는 사이토카인 TNF- α 의 양을 정량적으로 확인하였다(Fig. 3a). 한약재 WEX와 EEX를 각각 처리한 경우 모든 처리군에서 사이토카인 TNF- α 의 생성, 분비량이 무처리 대조군에서의 분비량에 비하여 감소하였다. 반대로 한약재 당귀(Ag), 구기자(Lc), 마가목(Sco) WEX 처리의 경우와 황기(Am), 산수유(Co) EEX

의 경우 100 ppm 농도로 처리하였을 때 각각 대조군과 비교하여 상대적으로 89.1, 95.8, 94.5%의 분비량이 감소하였다(Fig. 3a). 또한 당귀, 구기자 EEX 처리 시에 TNF- α 의 생성, 분비량이 각각 92.4, 92.0%로 나타났으며, 다른 한약재 처리에 비하여 가장 크게 억제되었다. 면역반응에 의해 활성화되어 분비되는 사이토카인 TNF- α 는 Th1 세포에서 분비되어 세포 매개성 면역반응을 유도하며 체액성 면역반응 활성을 억제한다²⁸. 그러나 최근 TNF- α 는, CD4+, CD8+ T 세포를 포함하여 대부분의 면역세포에서 분비되어, 염증반응의 활성화와 더불어 면역반응의 억제 기능을 동시에 가지는 면역조절 인자로 간주되고 있다²⁹. 결과적으로 TNF- α 는 예상대로 T 세포에서 분비되는 정도가 매우 낮으며, 한약재 추출물을 처리할 경우 대조군에 비해 분비가 더욱 억제되었다. 따라서 한약재 추출물의 처리는 염증성 사이토카인인 TNF- α 분비를 낮추어 염증반응 유도를 억제하고 또한 내재면역 단계에서 적응면역 단계로 면역반응을 전환시키는 기능을 하고 있는 것으로 판단된다.

2) IL-10 분비량 정량 분석

Th2 세포에서 분비되는 IL-10는 염증성 면역반응 유도와 사이토카인의 생성을 조절하여 T lymphocyte의 활성화를 조절함으로써 B lymphocyte의 활성화에 따른 체액성 면역의 활성화를 조절하고 세포성 면역 하향 조절 및 Th1 세포 활성을 억제능을 가진다³⁰. 또한 CD8+ T 세포는 IL-4가 주변 환경에 존재하는 조건에서 IL-10의 생산 및 분비를 통하여 과도한 면역반응을 조절하는 Treg 세포의 형질을 나타낸다²⁶. 본 실험에서는 무처리 대조군 T 세포에서의 IL-10 분비량 4.96 pg/ml에 비하여 한약재 WEX 처리 시 108.1~514.5%, EEX 처리 시 148.8~1156.9%로 WEX보다는 EEX의 경우 IL-10의 생성, 분비가 더욱 높게 증가하였다(Fig. 3b). 구기자(Lc) WEX의 25, 100 ppm 처리 시 IL-10의 분비량이 각각 384.73%, 514.5%로 증가하였고, 황기(Am) EEX의 25, 100 ppm 처리 시 각각 802.5%, 1156.9%로 증가

하여, 대부분의 한약재 추출물의 처리 시에 농도 의존적으로 IL-10의 생성, 분비량이 증가하였다. 따라서 T 세포에서 항염증성 사이토카인의 생성 및 분비가 증가함에 따라 염증 반응 유도를 억제하며,

T lymphocyte의 Th2 세포를 활성화시켜 최종적으로 적응면역의 핵심 인자인 B 세포의 성장 및 분화를 유도하는 것으로 판단된다.

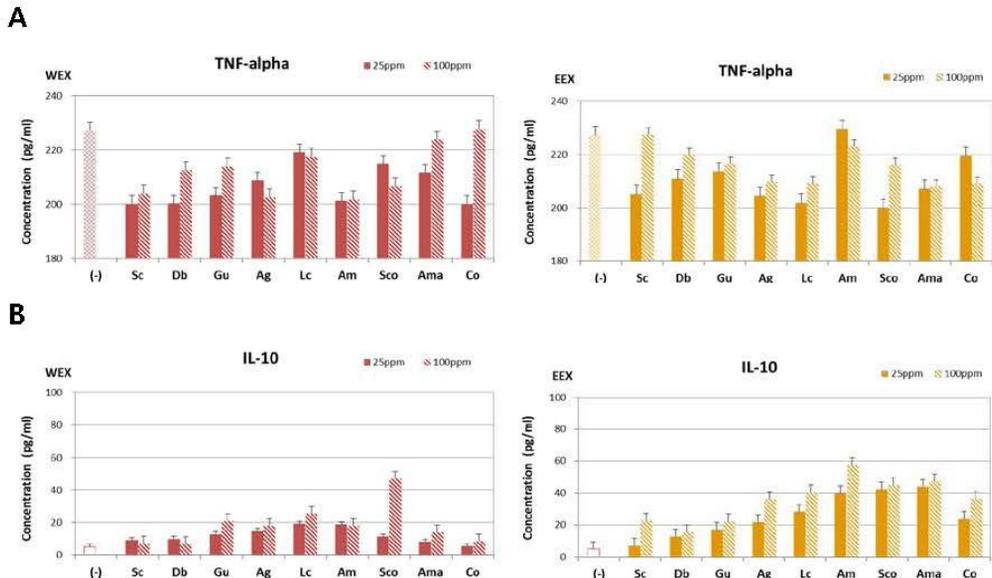


Fig. 3. Relative concentrations of cytokines, TNF- α , IL-10, released from TK-1 cells by treatment with herbal medicines, WEX and EEX.

TK-1 cell (1×10^6 cells) was cultured in a 60 mm culture dish and treated with two different concentrations of herbal medicine extracts, WEX and EEX, respectively. After incubation for 24 hours, ELISA assays were performed with indicated specific antibodies coated on the commercial ELISA plates in materials and methods. All data are mean of triplicated independent reactions. Abbreviated letters indicate each medicinal plant respectively, in Table 1.

IV. 결론

한약재 9종의 열수 및 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량을 확인하고 RAW 264.7 세포와 TK-1 세포에 각 추출물을 각각 처리하여 유도되는 사이토카인, TNF- α , IL-6, IL-10의 분비량을 확인하였다.

1. 총 9종의 한약재 추출물에 따라 폴리페놀 함량은 1.56~0.64 mg/고형분(g)으로 측정되었다.
2. 총 9종 한약재 추출물의 항산화 활성은 아스코르

빈산 500 ppm 처리한 대조군에 비해 95.6~31.5%로 확인되었다.

3. 한약재 WEX 및 EEX를 처리한 RAW 264.7 세포에서 TNF- α 의 분비는 LPS 단독처리 대조군에 비하여 각각 1.31 ± 0.16 , 1.18 ± 0.12 배로 증가하였고 IL-6의 양은 대조군과 비교하여 68.4~97.9%로 나타났으며 항염증 사이토카인 IL-10의 분비량은 한방소재 추출물의 처리에 의해 유의하게 억제되었다.
4. TK-1 세포의 경우 한약재 추출물의 농도에 따

라 TNF- α 분비가 유의하게 억제되었으며 IL-10의 분비량은 농도 의존적으로 증가하였다.

5. 한약재 추출물은 대식세포주에 작용하여 염증성 사이토카인의 분비를 유도하여 내재 면역 활동을 강화시키고 적응면역에 관여하는 T 세포에 작용할 때, 항염증성 사이토카인의 분비를 증가시켜 내재 면역반응의 억제를 유도한다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 안동대학교 기본연구지원사업에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005;6(11):1045-56.
2. Kim HS. The Cytokines: An Overview. *Yeungnam Univ J Med*2010;27(1):1-7.
3. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, and Verma IM. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 1996;274(5288):787-9.
4. Baud V, Karin MS. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*2001;11(9):372-77.
5. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015;16(5):448-57.
6. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*2014;6(10):a016295.
7. Pedersen BK, Åkerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* 2007;103(3):1093-8.
8. Kubo M, Motomura Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Front Immunol* 2012;3:275.
9. Jung H, Kim JD, Kim MR, Dangol M. Development of Vaccine Delivery System and Challenges. *KSBB Journal*2010;25(6):497-506.
10. Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J Med Microbiol*2012;61(7):927-34.
11. Ogawa C, Liu YJ, Kobayashi KS. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr Bioact Compd* 2011;7(3):180-97.
12. Sohn ES, Son E, Pyo S. A Current Research Insight into Function and Development of Adjuvants. *Immune Network* 2004;4(3):131-42.
13. Tan BK, Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. *Curr Med Chem* 2004;11(11):1423-30.
14. Hyun SH, Kim ES, Lee SM, Kyung JS, Lee SM, Lee JW, et al. Comparative Study on Immuno-Enhancing Effects of Red Ginseng Fractions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004;43(11):1665-73.
15. Song X, Hu S. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine* 2009;27(36):4883-90.
16. Rhee SD, Cho SM, Park JS, Han SB, Jeon YJ, Kim HM, et al. Chemical composition and biological activities of immunostimulants purified from alkali extract of *Poria cocos sclerotium*. *Kor J Mycol* 1999;27(4):293-98.
17. Kumar S, Gupta P, Sharma S, Kumar D. A review on immunostimulatory plants. *Journal of Chinese Integrative Medicine*2011;9(2):117-28.

18. Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995;16(3):128-30.
19. Kim HS, Kang JS. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J Korean Soc Food Sci Nut*2008;37(1):109-16.
20. Jeong HJ, Chung HS, An HJ, Kim JB, Lee EM, Park EJ, Kim HM. Immune-enhancement effect of the herbal combination Allergina. *Clin Chim Acta*2003;337(1):77-84.
21. Han HS. Anti-inflammatory effect of angelicae gigantis radix water extract on LPS-stimulated mouse macrophages. *Korea J Herbology* 2013; 28(5):113-9.
22. Kang BK, Kim MJ, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Bark SW, et al. The Anti-inflammatory effect of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) oil in LPS-induced Raw 264.7 cells and mouse models. *Microbiol. Biotechnol Lett* 2015;43(1): 45-55.
23. Jin SE, Kim OS, Yoo SR, Seo CS, Kim Y, Shin HK, et al. Anti-inflammatory effect and action mechanisms of traditional herbal formula Gamisoyo-san in RAW 264.7 macrophages. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:219.
24. Bachiega TF, Sforcin JM. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *J Ethnopharmacol* 2011;137(1): 909-13.
25. Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Ryu EJ, et al. Effect of black garlic extract on cytokine generation of mouse spleen cells. *J Life Sci*2013;23(1):63-8.
26. Noble A, Giorgini A, Leggat JA. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* 2006;107(11):4475-83.
27. Ryu HS. Effects of Job's Tears (Yul-Moo) extracts on mouse splenocyte and macrophage cell activation. *The Korean Journal of Food And Nutrition* 2008; 21(1):1-6.
28. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
29. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine* 2018;101:14-8
30. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55(2):241-69.