

누에와 육계 복합 추출물의 *in vivo* 면역증진 기능성 연구

김경조^{1#}, 박해진^{2#}, 김일규¹, 김민주¹, 신미래¹, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

2 : 대구한의대학교 산학협력단 코스메디컬센터

Evaluation on Immunopotential Activities of Combined Extract of Silkworm and *Cinnamomum cassia in vivo*

Kyeong Jo Kim^{1#}, Hae Jin Park^{2#}, Il Gyu Kim¹, Min Ju Kim¹
Mi-Rae Shin¹, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : Cosmedical Center, Academic Industry Cooperation, Daegu Haany University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to investigate the immunopotentiating activity of combine extract that Silkworm and *Cinnamomum cassia*. Recently, acute epidemic diseases such as cold and viral respiratory diseases have been emerging. So, interested in immunity enhancement has been increasing, and research on natural products to promote immunity activity has been actively conducted.

Methods : To confirm the immunopotentiating activity effect, Silkworm (SW), *Cinnamomum cassia* (CC), and SWCC combined extracts were treated 14 days at 300 mg/kg/day. The changes of glutamic oxalacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvate transaminase (GPT) in serum were analyzed after experiment. The changes in the total spleen cell number were measured. Immune cells in spleen were analyzed using fluorescence activated cell sorter (FACS). also, analyzed the expression of cytokines in spleen.

Results : Total number of cells in the spleen and FACS analysis of T lymphocytes activated in the spleen showed that the SWCC combined treated group had much higher frequency of active cells than both single groups. The ratio of CD4+CD8+, CD4+CD69+ and CD4+CD25+ T cells in spleen, SWCC is higher than other groups except Nor in CD4+, CD4+CD69+, CD4+CD25+ T cells. The results of this study suggest that SWCC can help immune function via IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ cytokine production, increased T lymphocytes and splenocyte proliferation.

Conclusion : Therefore, these results suggested that the SWCC combined extracts administration increase stronger immunity enhancement than when SW and CC administration.

Key words : Silkworm, *Cinnamomum cassia*, Immunopotential, splenocyte, T lymphocyte

I. 서 론

면역은 생체의 내부 환경이 체내에 생긴 불필요한 산물, 외부

감염물질로부터 침입하여 생긴 미생물 등을 항원으로 인식하고 방어하는 현상이다¹⁾. 생체의 방어기전은 크게 태어날 때부터 지니고 있는 선천적 면역 (innate immunity)과, 후천적으로

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Kyeong Jo Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : kkkjzzang@naver.com

· Received : 16 April 2018 · Revised : 14 May 2018 · Accepted : 25 July 2018

얻어지는 적응면역 (adaptive immunity)으로 구분된다²⁾. 선천적 면역반응은 대식세포 (macrophage)나 수지상 세포 (natural killer cell; NK)가 관여한다³⁾. 다양한 면역원에 대한 경험을 토대로 얻어진 후천적 면역반응은 선천적 면역반응 후에 제시되는 특이 항원을 인식하며 면역반응이 일어나고, T 세포나 B 세포가 관여하고 있다⁴⁾. T 세포는 크게 보조 T 세포 (helper T cell, Th cells)와 세포독성 T 세포 (cytotoxic T cell, Tc cells)로 나뉜다⁵⁾. 병원체 감염에 대해 중요한 역할을 하는 보조 T 세포는 세포성 및 체액성 면역 반응을 매개한다. 형태학적으로는 구분할 수는 없으나, 분비되는 사이토카인의 종류에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 나눌 수 있다⁶⁾. Th1 세포는 IL-2, IFN- γ , TNF- α 등을 생성하여 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하고, Th2 세포는 IL-4, IL-10 등을 생성하여 세포 외 병원체를 파괴하는데 필요한 항체를 생성하는 B 세포의 활성을 자극하는 역할을 한다⁷⁾.

누에 (*Bombyx mori* L.)는 누에나방과에 속하는 유충으로 섬유산업에 널리 이용되어 왔지만, 최근 곤충의 식품산업화 연구로 인해 소갈증을 치료하는, 항당뇨 효과가 뛰어난 고단백식품으로 알려져 있다⁸⁾. 누에 유래 천연 단백질인 silk fibroin은 혈중 ALT, AST 활성을 저해시켜 간 독성을 개선시켰다는 연구가 알려져 있고⁹⁾, 누에 실크 유래의 sericin 단백질은 항산화 효과가 높은 것으로 보고되었다¹⁰⁾. 그 외에도 고지혈증¹¹⁾, 혈당강하¹²⁾, 운동능력 향상¹³⁾ 등의 많은 연구가 보고되고 있다.

육계 (*Cinnamomum cassia* Presl.)는 녹나무과에 속하는 상록교목인 육계의 나무 줄기 껍질을 건조한 것으로, 건위약으로 식욕부진, 소화불량에 주로 쓰였으며, 진통 및 소염 작용, 면역 및 항암작용, 항균작용, 항미생물 효과까지 있는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁵⁾. 육계에서 분리한 수용성의 poly-meric polyphenol 화합물이 tumor cell line의 성장과 cell cycle의 조절에도 영향을 미친다는 연구가 알려져 있으며¹⁶⁾, 인삼과의 혼합물이 암 세포의 증식 억제 효과가 있는 등의 여러 연구가 보고되고 있다¹⁷⁾.

최근에는 감기, 바이러스성 호흡기 질환 등 급성 신종 전염병들이 등장하면서 면역력 증강효과에 대한 관심이 증가되고 있으며, 면역 활성 증진 효과를 검증하려는 우수한 천연물에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다¹⁸⁾. 본 연구는 이전 연구에서 면역 활성 증진 효과가 뛰어나다고 알려진 10가지 소재의 마우스 비장세포 증식능을 평가하여 얻은 *in vitro* 실험 결과를 바탕으로¹⁹⁾ 마우스 동물모델에서 누에와 육계 추출물의 단일, 복합 투여 시 면역 활성 증진 효과의 변화를 알아보고자 실험을 진행하였다. 실험동물의 혈액 내 간 기능 검사, 비장 내 총 세포 수와 면역세포 수를 측정하였다. 또한, 비장 내 활성 T 림프구의 활성 빈도를 형광 유세포 염색법을 통하여 측정하였고, 비장 세포 배양액 내의 사이토카인 발현량을 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출

본 실험에 사용한 누에, 육계는 음니허브 (대구, 한국)에서 구입하였고, 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실에서 생약 규격집에 맞추어 관능 검사하였고, 약전규격에 합격한 것만을 정선하여 실험에 사용하였다. 각 시료 100 g을 한일분쇄기 (FM-700SS, 한국)로 분쇄하여 환류추출기 (heating Mantle, MS-DM609/20L)에 넣고 100°C 에서 증류수를 1 l 가하여 120분 추출하였다. 그 후 감압추출장치 (N-1200A, EYELA, CO. LTD, Japan)를 이용하여 농축하였고, 동결건조기 (PF-10/ALPHA 1-2LD, Germany)를 통하여 완전 건조시켜 추출물을 얻었다. 누에의 수율은 27.4% 였으며, 육계의 수율은 25%로 나타났다. 이 추출물은 -80°C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 동물

체중 22~27 g 내외의 8주령 Balb/c계 수컷 생쥐 (샘타코 바이오, 오산)를 구입하여 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22±2°C, 습도 50±5% 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절 하였다. 사료는 고행사료 (Samyang corporation, Seoul, Korea) (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하며 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3. 면역 활성 증진 평가

1) 면역 증강 동물모델

실험군은 정상군 (control), 홍삼 추출물을 100 mg/kg/day로 투여한 양성대조군 (RG), 누에 추출물을 300 mg/kg/day로 투여한 군 (SW), 육계 추출물을 300 mg/kg/day로 투여한 군 (CC), 누에 육계 추출물을 300 mg/kg/day로 혼합하여 투여한 복합투여 군 (SWCC)으로 각 군별로 7마리씩 5군으로 나눈 뒤 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 쥐는 일정한 시간에 1회/1일 체중을 측정하였으며, 정상군을 제외한 실험군은 추출물을 14일간 경구 투여하였다. 실험종료 당일 마취 후 심장에서 혈액을 채취하여 30분 이내에 4,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 -80°C 냉동고에 보관하였고, 실험동물의 비장 조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 세포 수를 측정하였다.

2) 간 손상 지표 분석

심장에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 마우스 혈청의 glutamic oxalacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvate transaminase (GPT) assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

3) 비장 내 세포 수 측정

분리한 비장 조직에서 100mesh로 세포를 분리하였고, D-PBS를 이용하여 1700 rpm에서 5분간 원심분리 하여 2회

세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3g NH₄Cl, 1g KHCO₃, in 1L of demineralized water + 0.1mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포 수를 측정하였다.

4) 비장 내 활성화 T 림프구의 형광 유세포 분석

분리한 비장세포를 2 회 1%의 FBS가 함유된 PBS (FACS buffer)로 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포 이외의 불순물을 제거한 뒤, 각각의 시험관에 비장 세포를 5×10⁵ 세포로 조정한 후 4℃에서 면역 형광염색을 실시하였다. flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4+, CD8+, CD4+CD69+, CD4+CD25+, 그리고 CD69+B220+의 활성화세포 빈도(%)를 분석하였다.

5) 배양 비장세포에서의 사이토카인 분비량 측정

분리한 비장세포는 ACK 용액으로 RBC를 제거한 후 anti-CD3 mAb가 coating된 각각의 well에 5 × 10⁵ 세포씩 5% FBS-DMEM 배양액에서 48 시간 동안 배양하였다. 그 후, 원심분리기 2,000 rpm에서 3 분간 원심분리한 뒤, 200 μl의 배양상층액을 얻었다. 배양상층액내의 IFN-γ (BioSource, USA), IL-2 (BioSource, U.S.A.), IL-4, IL-10 (R&D system, U.S.A.)의 수준 측정은 TMB 기질을 100 μl씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 100 μl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, enzyme-linked immuno-sorbent assay를 이용하였다.

4. 통계분석

모든 측정결과는 독립적인 실험에서 도출된 대푯값의 평균과 표준편차로 표시하였으며, SPSS (Version 14.0, Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 각 군의 유의성은 p-value < 0.05 수준으로 t-test에 의해 검증하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 혈청 내 GOT 및 GPT 측정

혈액에서 분리한 혈청을 이용하여 간 손상 지표인 GOT 및 GPT를 측정 하였다. GOT 측정 결과, 양성대조군 (85.00 ± 19.00 U/L) 은 정상군 (62.00 ± 10.00)에 비하여 유의성 있게 증가하였고 (p<0.05), SW 투여군 (88.00 ± 24.00)과 CC 투여군 (81.00 ± 19.00) 또한 유의성 있게 증가하였다 (p<0.05). 그러나, SWCC 복합투여군 (65.00 ± 16.00)은 정상군에 비하여 유의성있게 증가하였지만 가장 낮은 결과를 보였다 (p<0.05)(Fig. 1A).

혈청 내 GPT 측정 결과, 양성대조군 (23.00 ± 2.00 U/L) 은 정상군 (27.00 ± 4.00)에 비하여 유의성있게 감소하였고 (p<0.05), SW 투여군 (26.00 ± 3.00)과 CC 투여군 (23.00 ± 5.00) 은 감소하는 경향을 나타냈으며, SWCC 복합투여군 (25.00 ± 4.00) 또한 정상군에 비하여 감소하는 경향을 나타 내었다 (Fig. 1B).

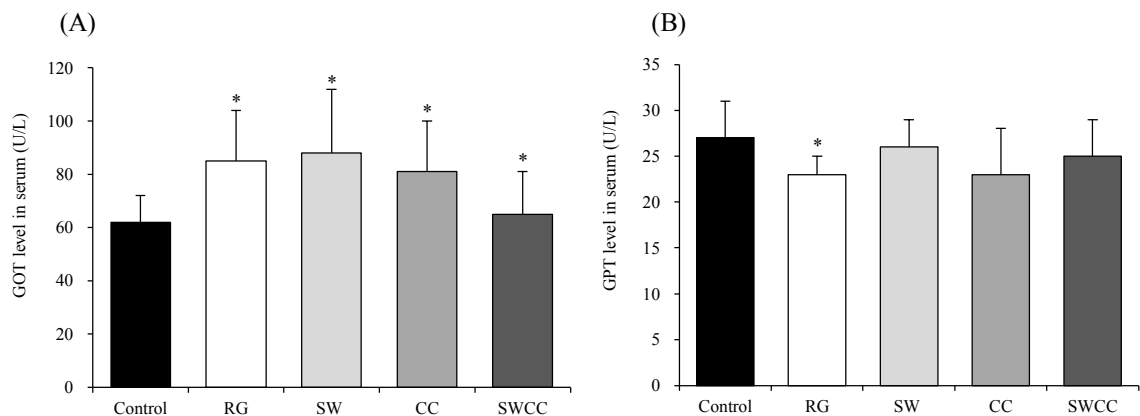


Fig. 1. glutamic oxalacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvate transaminase (GPT) in serum. GOT level in Immunopotentiation mice; (A), GPT level in Immunopotentiation mice; (B). normal mice; Control, Red-ginseng 100 mg/kg body weigh positive control mice; RG, Silkworm 300 mg/kg body weight mice; SW, Cinnamomum cassia 300 mg/kg body weight mice; CC, combine Silkworm and Cinnamomum cassia 300 mg/kg body weight mice; SWCC. All data are expressed means ± SEM, n=6 rat per group. Significance: *p<0.05 vs. Control mice.

2. 비장 내 세포 수 측정

분리한 비장조직에서 세포를 분리한 뒤 비장 내 총 세포 수와, 비장 내 T 세포와 B 세포의 수를 측정하였다. 비장 내 총 세포 수 측정 결과, 양성대조군 (8.30 ± 1.00 × 10⁶)은 정상군 (5.85 ± 0.45 × 10⁶)에 비하여 유의성 있게 증가하였고 (p<0.01), SW 투여군 (5.05 ± 1.05 × 10⁶)은 감소하였지만, CC 투여군

(5.80 ± 1.10 × 10⁶)은 증가하는 경향을 보였으며, SWCC 복합투여군 (6.60 ± 0.50 × 10⁶)은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 (p<0.05)(Fig. 2A).

도움 T 세포 (helper T cell)의 표면에서 대식세포와, T 세포, B 세포를 활성화 시키는 단백질 분자인 CD4+ T 세포 수를 측정한 결과, 양성대조군 (18.44 ± 2.67 × 10⁵)은 정상군

($15.14 \pm 3.26 \times 10^5$)에 비하여 증가하는 경향을 나타내었고, SW 투여군 ($10.58 \pm 2.10 \times 10^5$), CC 투여군 ($11.16 \pm 4.02 \times 10^5$)과 SWCC 복합투여군 ($12.58 \pm 0.20 \times 10^5$)은 정상군에 비하여 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2B). 세포독성 T 세포 (cytotoxic T cell)의 표면에서 감염된 세포를 없애는 단백질 분자인 CD8+ T 세포 수를 측정할 결과, 양성대조군 ($15.42 \pm 1.41 \times 10^5$)은 정상군 ($8.01 \pm 0.26 \times 10^5$)에 비하여 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.001$), SW 투여군 ($12.10 \pm 2.54 \times 10^5$)은 증가하는 경향을 보였으며, CC 투여군 ($13.20 \pm 1.92 \times 10^5$)과 SWCC 복합투여군 ($20.18 \pm 0.91 \times 10^5$)은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.01$) $p < 0.001$) Fig. 2C). CD4+CD69+ T 세포 수는, 양성대조군 ($1.78 \pm 0.54 \times 10^5$)은 정상군 ($0.74 \pm 0.20 \times 10^5$)에 비하여 증가하는 경향을 보였고, SW 투여군 ($1.40 \pm 0.56 \times 10^5$), CC

투여군 ($1.40 \pm 0.02 \times 10^5$)과 SWCC 복합투여군 ($2.16 \pm 0.33 \times 10^5$) 모두 정상군에 비하여 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2D). CD4+CD25+ T 세포 수 측정 결과, 양성대조군 ($2.70 \pm 0.37 \times 10^5$)은 정상군 ($1.72 \pm 0.05 \times 10^5$)에 비하여 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.01$), SW 투여군 ($1.71 \pm 0.19 \times 10^5$), CC 투여군 ($1.85 \pm 0.29 \times 10^5$)은 증가하는 경향을 나타냈으며, SWCC 복합투여군 ($1.74 \pm 0.03 \times 10^5$)은 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.001$) (Fig. 2E). B220+CD269+ B 세포 수는, 양성대조군 ($0.82 \pm 0.02 \times 10^5$)은 정상군 ($0.50 \pm 0.07 \times 10^5$)에 비하여 유의하게 증가하였고 ($p < 0.001$), SW 투여군 ($0.41 \pm 0.01 \times 10^5$), 은 감소하였지만, CC 투여군 ($0.92 \pm 0.12 \times 10^5$)과 SWCC 복합투여군 ($1.32 \pm 0.03 \times 10^5$) 모두 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다 ($p < 0.01$) $p < 0.001$) (Fig. 2F).

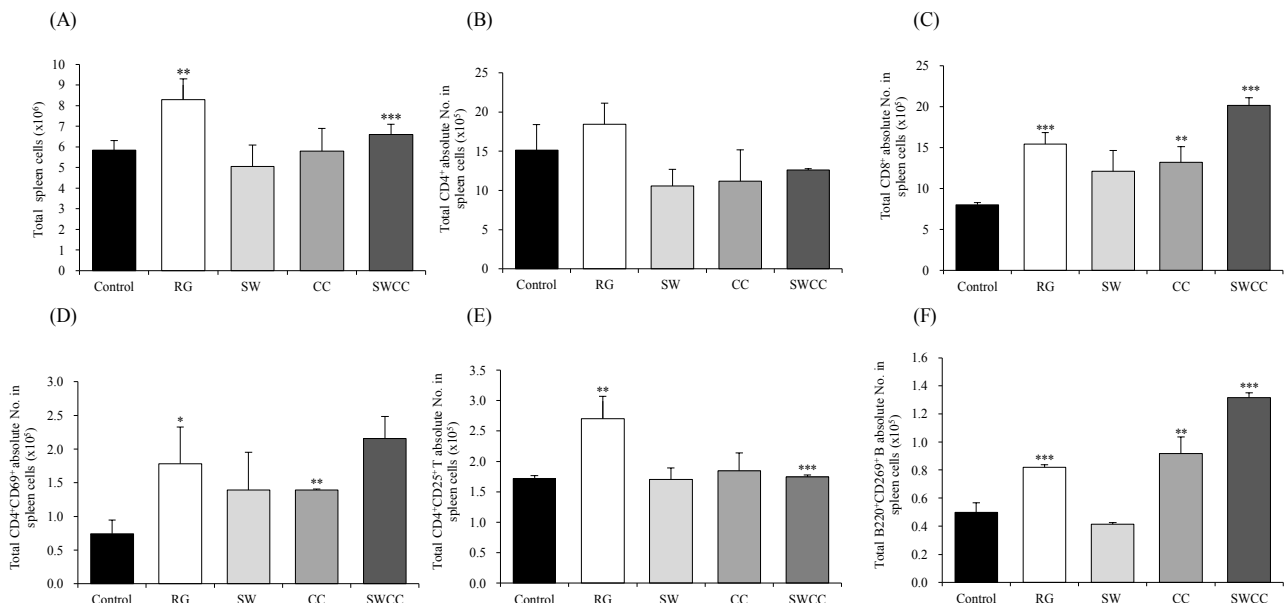


Fig. 2. Effect of Silkworm and combined extract on total cells and immune cells in spleen, total cells number in spleen; (A), CD4+ T cells number in spleen cells; (B), CD8+ T cells number; (C), CD4+CD69+ T cells number; (D), CD4+CD25+ T cells number; (E), B220+CD69+ B cells number; (F), normal mice; Control, Red-ginseng 100 mg/kg body weight positive control mice; RG, Silkworm 300 mg/kg body weight mice; SW, Cinnamomum cassia 300 mg/kg body weight mice; CC, combine Silkworm and Cinnamomum cassia 300 mg/kg body weight mice; SWCC. All data are expressed means \pm SEM, n=6 rat per group. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control mice.

3. 비장 내 면역세포 활성 빈도 측정

분리한 비장조직에서 면역세포를 분석한 결과, CD4+ T 세포 비율은 정상군의 경우 25.6%로 나타났고, 양성대조군의 경우 22.1%로 정상군에 비하여 약간 감소하였다. SW 투여군은 21%로 나타났고, CC 투여군은 18.5%로 나타났으며, SWCC 투여군은 19.7%로 투여군 모두 정상군에 비하여 감소하는 모습을 보였다. CD8+ T 세포 비율은 정상군의 경우 44.39%였으며, 양성대조군은 18.6%, SW 투여군은 23.9%, CC 투여군은 22.9%, SWCC 복합 투여군은 29.1%로 정상군에 비하여 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3A).

CD4+CD69+ T 세포의 변화를 분석한 결과, 정상군의 경우 1.3%로 나타났으며, 양성대조군의 경우 2.1%로 증가하는 모습을 확인하였으며, SW 투여군은 2.1%, CC 투여군은 2.0%로

정상군에 비해 증가하였다. 특히 SWCC 복합투여군은 2.2%로 가장 높은 비율을 보였다 (Fig. 3B).

CD4+CD25+ T 세포 비율은, 정상군의 경우 3.0%로 나타났으며, 양성대조군은 2.7%, SW 투여군은 2.5%, CC 투여군은 2.6%로 정상군에 비하여 미약하게 감소한 모습을 확인하였다. 그러나 SWCC 투여군은 2.9%로 정상군에 비하여는 감소하였지만 단일 투여군에 비해서는 가장 높은 비율을 나타냈다 (Fig. 3C).

B220+CD69+ B 세포 비율 측정 결과, 정상군은 0.8%로 나타났으며, 양성대조군은 1.0%로 정상군에 비해 증가하였으며, SW 투여군은 0.8%, CC 투여군은 1.6%로 나타났고, 특히 SWCC 복합 투여군은 2.8%로 가장 높은 비율로 나타난 것을 확인하였다 (Fig. 3D).

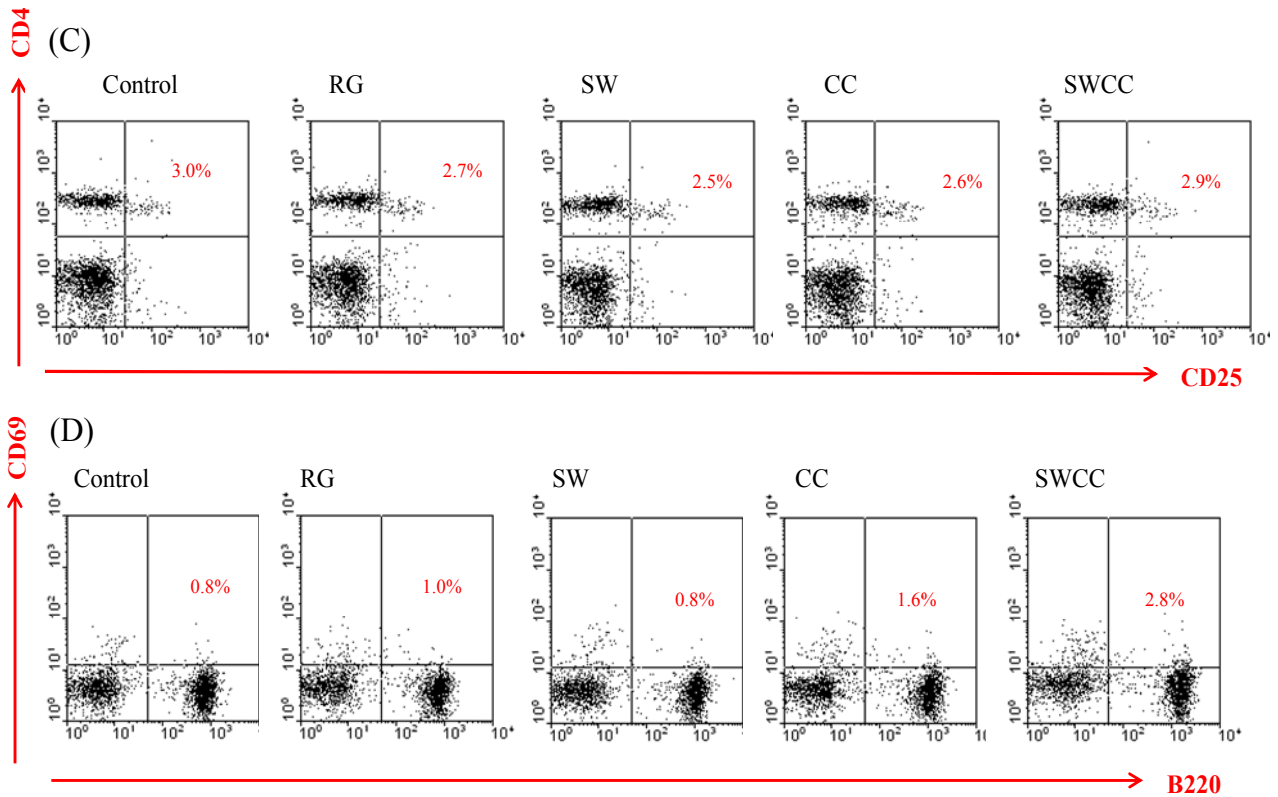


Fig. 3. The number of T cells and B cells population in spleen. CD4+, CD8+ T cells; (A), CD4+CD69+ T cells; (B), CD4+CD25+ T cells; (C), B220+CD269+ B cells; (D), normal mice; Control, Red-ginseng 100 mg/kg body weight positive control mice; RG, Silkworm 300 mg/kg body weight mice; SW, Cinnamomum cassia 300 mg/kg body weight mice; CC, combine Silkworm and Cinnamomum cassia 300 mg/kg body weight mice; SWCC.

4. 비장세포 배양액 내 사이토카인 발현량 분석

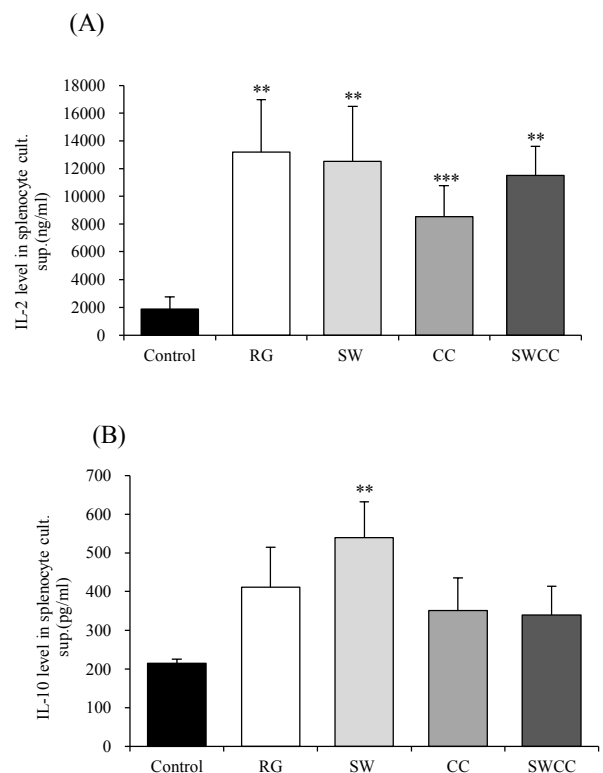
비장세포 배양액 내 사이토카인 발현량 분석 결과, IL-2의 발현량은 양성대조군 (13208.70 ± 3760.40 ng/ml)은 정상군 (1874.12 ± 889.03)에 비하여 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.01$), SW 투여군 (12524.10 ± 3953.40)과 CC 투여군 (8547.40 ± 223.91), SWCC 복합투여군 (11524.60 ± 2081.52)모두 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.01$)($p < 0.001$) Fig. 4A).

IL-10의 발현량은 양성대조군 (411.67 ± 103.47 pg/ml)은 정상군 (214.93 ± 10.41)에 비하여 증가하는 경향을 나타냈고, SW 투여군 (538.55 ± 92.79)은 정상군에 비하여 유의하게 증가하는 모습을 나타냈다 ($p < 0.001$). CC 투여군 (351.42 ± 83.94)과 SWCC 복합투여군 (339.59 ± 74.55)모두 정상군에 비하여 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4B).

IL-12의 발현량은 양성대조군 (21.37 ± 1.17 pg/ml)은 정상군 (19.28 ± 1.45)에 비하여 증가하는 경향을 나타냈고, SW 투여군 (24.78 ± 1.61)은 정상군에 비하여 유의하게 증가하는 모습을 나타냈다 ($p < 0.01$). CC 투여군 (20.20 ± 0.91)과 SWCC 복합투여군 (20.48 ± 0.76)모두 정상군에 비하여 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4C).

IFN- γ 의 발현량은 양성대조군 (6084.00 ± 5678.47 pg/ml)은 정상군 (75.75 ± 36.34)에 비하여 증가하는 경향을 나타냈고, SW 투여군 (5915.05 ± 3921.16)은 정상군에 비하여 유의하게 증가하는 경향을 나타냈다. CC 투여군 ($1097.16 \pm$

958.01)과 SWCC 복합투여군 (1844.12 ± 1154.57)모두 정상군에 비하여 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4D).



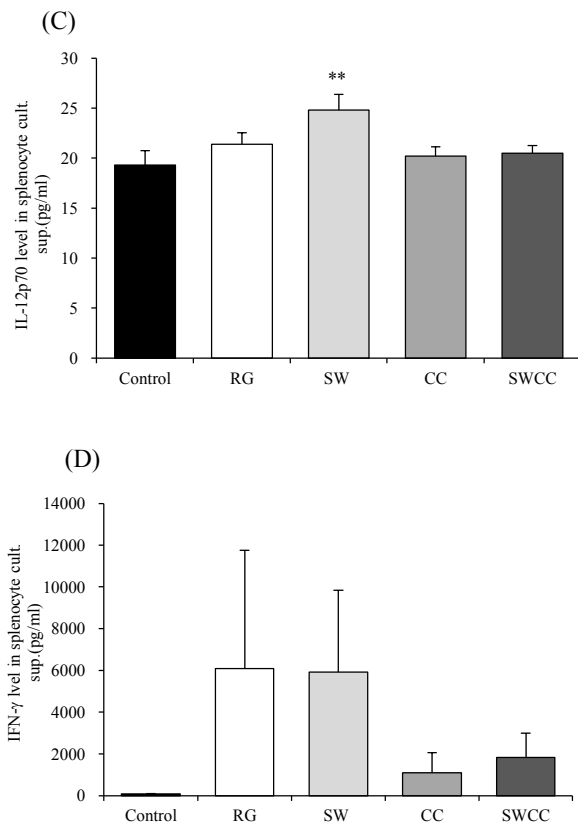


Fig. 4. Expression of immune-related proteins in spleen cell culture. immune-related proteins IL-2; (A), IL-10; (B), IL-12; (C), IFN- γ ; (D), normal mice; Control, Red-ginseng 100 mg/kg body weight positive control mice; RG, Silkworm 300 mg/kg body weight mice; SW, Cinnamomum cassia 300 mg/kg body weight mice; CC, combine Silkworm and Cinnamomum cassia 300 mg/kg body weight mice; SWCC. All data are expressed means \pm SEM, $n=6$ rat per group. Significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control mice.

IV. 고 찰

면역반응이란 외부로부터 침입하는 미생물, 체내에서 생긴 불필요한 산물 등을 항원으로 인식하고 항체를 생산하여 신체를 보호하는 방어과정으로서, 항상성 유지에 의하여 균형을 이루는 반응을 말한다²⁰⁾. 면역 조절 능력의 항상성 유지는 질병의 예방과 치료에 중요한 작용을 한다²¹⁾. 체내에는 혈액, 비장, 임파절, 흉선 등 여러 기관에 많은 면역세포들이 내포되어 있으며, 대식세포, NK 세포, T 세포, B 세포 등의 세포들이 면역에 관여하고 있다²²⁾. 병원균이 침입하면 내재면역에 의해 제거되지 못한 항원이 적응면역을 활성화시켜 T 세포, B 세포에 의하여 면역글로불린 및 사이토카인을 분비하고 병원균을 제거하는 과정을 거치게 된다²³⁾. 최근 고령화, 산업화 등으로 인해 면역 관련 질환이 증가하는 추세로 면역 활성화 증진에 대한 관심이 상승되고 있으며, 면역 질환의 치료 및 예방의학의 한계점으로 인해 식품소재의 연구가 활발하게 진행되는 추세이다. 이에 본 연구자는 고단백 식품소재로 사용되고 있는 누에와 항암,

항염증 등 면역 질환의 치료제로 많은 연구가 진행되고 있는 육계를 이용하여 마우스 동물모델에서의 단일, 복합 투여를 통해 면역 활성화 증진에 대한 효과를 확인하였다.

면역 활성화 증진 평가를 위해 8주령의 수컷 마우스에 누에 및 육계 단일, 복합 추출물을 300 mg/kg/day로 14일간 경구투여한 뒤 얻은 혈청 및 비장조직을 분석하여 간 독성 정도와 면역 활성화 증진 효과를 평가하였다. 혈액생화학적 효소이며, 간 손상 지표로 알려져 있는 GOT와 GPT를 측정된 결과, GOT의 경우 정상군에 비하여 RG, SW, CC 단독 투여군과 SWCC 복합 투여군 모두 유의하게 증가하였다. 그러나 SWCC 복합 투여군은 단독 투여군에 비하여 감소하는 모습을 나타냈다. GPT의 경우 모든 투여군이 감소하는 경향을 나타내었다.

면역 활성화 증진 효과를 확인하기 위해 분리한 비장 조직에서 세포를 분리한 뒤 비장 내 총 세포수와, 비장 내 T 세포와 B 세포의 수를 측정하였다. 비장은 면역력을 관장하는 주요기관으로 혈액으로부터 항원을 수집하여 T 세포와 B 세포를 성숙시키며, 림프구의 분화가 일어난다²⁴⁾. T 세포의 증식반응은 MHC (Major histocompatibility complex) 분자에 결합된 항원을 인지함으로써 두 종류로 나누어 진다. MHC II 분자는 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하는 Th1과, B 세포의 활성을 자극해 항체 생산을 증가시키는 Th2가 존재하며, 표면에서 CD4+ 단백질이 표적세포로서 인지된다²⁵⁾. MHC I 분자는 Tc 세포의 영향을 받아 감염된 세포를 없애는 세포사멸의 역할을 하며, 표면에서 CD8+ 단백질이 표적세포로서 인지된다²⁶⁾. 비장 내 총 세포 수는 SW, CC 단독 투여군에서는 정상군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았지만, SWCC 복합 투여군에서는 유의하게 증가하는 모습을 확인 하였다. CD4+ T 세포의 경우에는 SW, CC 단독 투여군과 SWCC 복합 투여군 모두에서 유의하진 않지만 정상군에 비해 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 그러나 CD8+ T 세포의 경우, SW 단독 투여군은 정상군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, CC 투여군은 유의하게 증가하였고, 특히 SWCC 복합 투여군은 가장 유의하게 증가하는 모습을 보였다. 이는 약물 투여가 Th 세포 보다 Tc 세포를 활성화 시킨 것으로 사료되며 단독 투여군 보다 복합 투여군의 효과가 더 큰 것으로 확인된다. CD4+CD25+ T 세포는 흉선에서 생성되는 조절 T 세포 (regulatory T cell, Treg)로 자기방어에 특이성을 가지는 세포로 자가면역질환에 있어 Treg 세포의 결핍이나 억제 기능의 상실이 관여함이 알려져 있다²⁷⁾. CD4+CD25+ T 세포의 경우 SW, CC 단일 투여군은 정상군에 비해 증가하는 경향을 나타냈고, SWCC 복합 투여군은 유의하게 증가하는 모습을 확인하여 SWCC 복합 투여는 Treg 세포의 활성을 자극하는 것으로 사료된다.

Th 세포는 분비하는 세포활성물질 (cytokine)에 의해 IL-2, IFN- γ , TNF- α 등을 생성하여 대식세포의 활성을 증가시키는 Th1 세포와 IL-4, IL-5, IL-10 등을 생성하여 B 세포의 활성을 자극하는 Th2 세포로 나뉘어 진다²⁸⁾. 비장 세포 배양액 내의 사이토카인 발현량을 분석한 결과 SW, CC 단독 투여군은 정상군에 비해 증가하였고, 특히 SWCC 복합 투여군은 단독 투여군에 비해 증가한 모습을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 누에, 육계 복합 투여군은 단독 투여군에 비해 비장 내 면역 관련 세포, 비장 내 세포 활성화 빈도, 비장세포 배양액 내 세포활성 물질의 활성화 효과가 우수하다는 결과를

었으며, 이는 누에, 육계 복합 추출물이 단독 투여군에 비해 높은 면역 활성 증진 효과가 있다고 판단되는 바이다.

V. 결 론

본 연구에서는 누에, 육계 단일 추출물과 복합 추출물을 경구 투여 비교하였고, 실험동물의 면역 활성 증진 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 누에, 육계 복합 추출물의 경구 투여는 혈액에서 GOT, GPT의 수치를 감소시켰다.
2. 누에,육계 복합 추출물의 경구 투여는 비장조직 내 총 세포수를 유의하게 증가시켰고, 비장 내 CD8+ T 세포와 CD4+CD25+ T 세포 수를 유의하게 증가시켰다.
3. 누에, 육계 복합 추출물의 경구 투여는 비장 세포 배양액 내의 IL-2, IL-10, IL-12, IFN- γ 의 발현을 유의하게 증가시켰다.

따라서 누에, 육계 복합 추출물의 경구 투여는 T 세포 및 B 세포를 활성화시켜 단독 투여에 비해 비교적 높은 면역 활성 증진 효과를 나타내었으며, 이는 기능성 식품 소재로 활용될 가능성이 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구결과는 2016년도 산업통상자원부에서 시행한 지역 주력산업 공동기반기술활용지원사업 (R0005510)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Son GH, Shin SW, Kwon YK, Kim SC, Park JH. Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted *Aconiti Lateralis Preparata* Radix, *Zingiberis Rhizoma*, *Cinnamomi* Cortex and *Evodiae* Fructus. *Korean J. Orient Phy & Path.* 2005 ; 19(4) : 1000-10.
2. Abo T, Kawamura T, Watanabe H. Immunologic states of autoimmune diseases. *Immunol. Res.* 2005 ; 33 : 23-34.
3. Kim JY, Cho JY. Anti-inflammatory effects of ginseng-derived active principles. *J Ginseng Res.* 2007 ; 1(2) : 17-23.
4. Yu AR, Park HY, Kim YS, Ha SK, Hong HD, Choi HD. Immuno-enhancing effect of seed extracts on a RAW264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012 ; 41 : 1671-76.
5. Lee SH, Lee SE, Lee SH, Shin JY. Immune Function-enhancing Effects of *Bojungikkittanggami-bang*. *Korean J Orient Phy & Path.* 2004 ; 18(2) : 528-33.
6. Chae SY, Shin SH, Ha MH, Jo SK, Kim SH, Byun MW, Yee ST. Effect of *Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang* on Proliferation of T Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004 ; 33(7) : 1085-91.
7. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Blüthmann H, von Boehmer H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature.* 1988 ; 335 : 229-33.
8. Kim I, Lee HS, Kim JW, Yang BK, Ahn MY, Kim DH. Variation of mineral compositions in the regional, varietal, and seasonal mulberry leaves. *Int. J. Indust. Entomol.* 2001 ; 2 : 27-35.
9. Kang GD, Lee KH, DO SG, Kim CS, Suh JG, Oh YS, Nham JH. Effect of silk fibroin on the protection of alcoholic hepatotoxicity in the liver of alcohol preference mouse. *Int. J. Indust. Entomol.* 2001 ; 2 : 15-8.
10. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998 ; 62 : 145-7.
11. Kang PD, Kim JW, Jung IY, Kim KY, Kang SW, Kim MJ, Ryu KS. Study on the unsaturated fatty acids in the pupae of silkworm, *Bombyx mori*. *Kor. J. Seric. Sci.* 2006 ; 48 : 21-4.
12. Ryu KS, Lee HS, Chung SH, Kang PD. An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative condition of silkworm powder. *Kor. J. Seric. Sci.* 1997 ; 39 : 79-85.
13. Kim TH, Ahn HY, Kim YW, Sim SY, Cho HD, Kim MD, Lee YJ, Cho YS. Hepatoprotective Effect of *Bacillus subtilis*-fermented Silkworm (*Bombyx mori* L.) Extract on Non-alcoholic Fatty Liver in Rats. *J of Life Science.* 2007 ; 27(9) : 1031-39.
14. Kim KJ, Shin MR, Kim SH, Kim SJ, Lee AR, Kwon OJ, Kil KJ, Roh SS. Anti-inflammatory and apoptosis improving effects of sulfasalazine and *Cinnamomi* cortex and *Bupleuri* radix mixture in TNBS-induced colitis mouse model. *Appl Biol Chem.* 2017 ; 60(3) : 227-34.
15. Kim DG, Yoo DY. The Effects of *Cinnamomum loureirii* on Osteoblast in Murine Rat Calvarial Cells. *J OOG.* 2012 ; 25 : 61-70.
16. Schene NW, Kelly MA, Marilyn MP, Anderson RA.

- Water-soluble polymeric polyphenols from cinnamon inhibit proliferation and alter cell cycle distribution patterns of hematologic tumor cell lines. *Cancer Lett.* 2005 ; 230 : 134-40.
17. Lee SY, Kim HS, Kim JO, Hwang SW, Hwang SY. Effect of Ethanol Extracts of Cinnamon on the Proliferation and COX-2 Pathway in HT-29 Human Colon Cancer Cell Line. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2006 ; 35(9) : 1115-20.
 18. Yang JW, Jeon HL, You YH, Kim JY, Choi HK. Citrus Ethanol Extracts Promotes Innate Immune Response by Activating NF- κ B. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015 ; 44(9) : 1256-63.
 19. Lee AR, Kim SH, Kim SJ, Kim KJ, Lee YC, Roh SS. Evaluation of Immunopotential Activities of Combined Extract of Silkworm and Food material. *Kor. J. Herbol.* 2017 ; 32(4) : 1-8.
 20. Tomasi TB Jr, Tan EM, Solomon A, Prendergast RA. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J Exp Med.* 1965 ; 121 : 101-24.
 21. Na CS, Shin W, Lee YM, Moon YS, Noh HK, Seo SH, Son HS. Effect of original *kyungokgo* & *iksuyongjingo* plus *Sparassis crispa* on antioxidant, immunity improvement and sensory evaluation. *Kor. J. Herbol.* 2016 ; 31(4) : 43-51.
 22. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1996 ; 211 : 24-32.
 23. Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?. *Trends Immunol.* 2004 ; 25 : 640-4
 24. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell.* 1992 ; 70 : 705-7.
 25. Ha YJ, Kim OK, Nam DE, Kim YJ, Kim E, Jun WJ, Lee JM. Effects of *Curcuma longa* L. Extracts on Natural Killer Cells and T Cells. *Korean J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015 ; 44(3) : 307-13.
 26. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Blüthmann H, von Boehmer H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature.* 1988 ; 335 : 229-33.
 27. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debre P, Piette JC, Gorochov G. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2005 ; 175(12) : 8392-400.
 28. Adams OD, Hamilton TA. Molecular basis of macrophage activation and its origins. New York, Oxford University Press, 1992 ; 1 : 75-114.