

## 참치(*Katsuwonus pelamis*) 자숙액 농축물의 마우스 대식세포 및 비장세포에 대한 면역증강활성

강보경 · 김꽃봉우리<sup>1</sup> · 안나경 · 최연욱 · 김민지<sup>1</sup> · 박시우 · 박원민  
김보람 · 박지혜 · 배난영 · 안동현\*

부경대학교 식품공학과/식품연구소 <sup>1</sup>부경대학교 수산과학연구소

### Immuno-stimulating Activities of Skipjack Tuna *Katsuwonus pelamis* Cooking Juice Concentrates on Mouse Macrophages and Spleen Cells

Bo-Kyeong Kang, Koth-Bong-Woo-Ri Kim<sup>1</sup>, Na-Kyung Ahn, Yeon-Uk Choi, Min-ji Kim<sup>1</sup>, Si-Woo  
Bark, Won-Min Pak, Bo-Ram Kim, Ji-Hye Park, Nan-Young Bae and Dong-Hyun Ahn\*

Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University,  
Busan 608-737, Korea

<sup>1</sup>Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 619-911, Korea

Tuna cooking juice concentrate (TCJC) is by-produced during the canning processing of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* and it is well known that TCJC contains various nutritional components. Therefore, the immuno-stimulating activity of TCJC was investigated using macrophage RAW 264.7 cell line and the spleen cell isolated from BALB/c mice. The TCJC increased the production of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  in a dose-dependent manner compared to the control in RAW 264.7 cells without any toxicity. In particular, the production of TNF- $\alpha$  was increased over 300-fold. The production of both Th1 cytokine (such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, and IL-12) and Th2 cytokine (IL-4, IL-6, IL-10) was also increased by TCJC treatment in splenocytes. Moreover, the TCJC increased the splenocyte proliferation in a concentration-dependent manner compared to control. These results indicate that TCJC may enhance immune function by promoting various cytokine production.

Key words: Tuna Cooking Juice, Cytokines, Immune-stimulating Activities, *Katsuwonus pelamis*

### 서 론

면역은 인체의 주요 방어 기전으로, 외부 물질의 침입이나 감염작용에 대해 다양한 면역세포가 작용하여 인체를 방어하는 기능을 지칭하며(Hancock and Diamond, 2000), 대식세포가 관련된 비특이적 면역반응과, T 및 B cell이 관여하는 특이적 면역반응으로 나뉜다(Seo et al., 2009). 비특이적 면역반응, 즉 자연면역에서 대식세포는 체내 모든 조직에 널리 분포하며, 1차적으로 bacteria나 virus와 같은 감염성 병원체 또는 암세포 및 노화된 정상세포를 탐식작용을 통해 제거함과 동시에 interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$  및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등의 cytokine을 분비하며, 항원제시작용을 하여 면역반응을 극대화

시키는 매개 역할을 한다(Yu et al., 2012a). 특이적 면역은 적응 면역이라고도 하며, 항원제시세포가 포식 후 제시한 항원 정보를 T cell이 인식하여 일어나는 면역 반응으로, T 및 B cell이 관여한다(Yoon, 2008). 특히 CD4+ T cell은 helper T (Th) 림프구라고도 하며, 방어 면역에서 가장 중요하게 작용하는 세포로 대식세포와 함께 cytokine 분비를 통해 면역반응을 유도한다. 이러한 Th cell은 Th1 및 Th2 세포로 각각 분화되며 서로 다른 면역작용에 관여하게 된다(Mosmann and Coffman, 1989). 그 중 Th1 cell 유도 cytokine은 IL-2, IL-12, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 및 TNF- $\alpha$ 가 있으며, 주로 세포매개성 면역작용을 활성화하고, Th2 cell 유도 cytokine에는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10이 있으며 주로 항체 생성에 의해 매개되는 체액성 면역작용을 활성화한

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0776>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 47(6) 776-784, December 2014

Received 14 November 2014; Revised 22 December 2014; Accepted 30 December 2014

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5831 Fax: +82. 51. 629. 5824

E-mail address: dhahn@pknu.ac.kr

다. 이러한 Th1 및 Th2 cell은 서로 균형을 이룸으로써 면역작용을 조절하게 된다(Liblau et al., 1995; Rengarajan et al., 2000).

최근 경제 성장 및 공업화의 추진, 환경오염, 식생활의 변화 등이 인체 내부의 항상성을 변화시키기에 따라 암, 후천성면역결핍증 등의 면역계 질환이 증가되고 있다(Park et al., 2006a). 이러한 면역계 질환을 치료하기 위해 예로부터 많은 면역 요법이 행해지고 있으나(Fahey and Myers, 1975; Oettingen, 1990; Nikonenko et al., 1996), 임상적 이용에는 여러 문제점을 가지고 있는 실정이다. 대표적 예로 cytokine, lymphokine, growth factor 등을 직접 투여하여 생체 면역계를 조절하는 방법이 있는데(Oldham, 1995), 체내에서 cytokine은 여러 종류가 상호 작용을 통해 서로의 작용을 상승 또는 억제하여 면역작용을 조절하기 때문에, 하나 또는 두가지의 cytokine을 대량 투입하여도 큰 효과를 기대할 수 없고, 독성이 강하며 혈중 적정 농도를 계속해서 유지하기 어려운 단점이 있다. 따라서 체내에서 여러 면역 세포를 자극함으로써 cytokine을 유도하는 보다 안전한 생리 활성물질 탐색에 대한 노력이 증가되고 있다(Bergelson, 1995; Han et al., 1998; Kim et al., 2013).

한편, 참치(*Katsuwonus pelamis*)는 농어목 고등어과의 바닷물고기로, 고단백 식품으로 영양학적으로 우수하며, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3)와 docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3)와 같은 고도불포화지방산을 다량 함유하고 있다(Kim et al., 2013). 참치는 우리나라에서 연간 약 26만 톤 정도가 어획되고 있으며, 주로 자숙처리가 동반되는 통조림 및 가쓰오부시 등의 소재로 이용되고 있다(Byun, 2012). 이러한 가공 공정에서 나오는 참치 자숙액은 연간 약 2만 7천 톤에 달하며, 단백질, glycogen, 기능성 peptide와 풍부한 유리 아미노산 및 콜라겐 유래 단백질인 carnosine 및 taurin 등을 다량 함유하여 영양학적으로 우수하나(Kim et al., 2001; Oh, 2007; Shiao and Chai, 1990), 이의 활용에 대한 연구로는 항산화(Lee et al., 2008; Jang et al., 2009), 항암(Jang et al., 2009) 및 항고혈압(Hwang, 2010)에 대한 연구만이 진행되어 있으며, 면역계 조절 및 면역 증강 작용에 대한 연구는 진행된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 수산가공 부산물로 발생하는 참치 자숙액의 기능성 소재로의 이용 가능성을 살펴보고자 참치 자숙액의 마우스 대식세포 및 비장세포에 대한 면역증강 작용을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

본 실험에서 비장세포 분리 배양을 위해 생후 5주령의 수컷 BALB/c 마우스를 이용하였다. 마우스는 오리엔트바이오(Orient Co., Seongnam, Korea)에서 구입하여 온도  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 10\%$ , 12시간의 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일간 예비사육한 후 실험에 사용하였다.

### 실험 재료

본 실험에 사용한 탈염 참치 자숙액은 동원식품연구소에서 제공받은 것으로 31 Brix의 농축액을  $4^\circ\text{C}$ 에 저장하며 사용하였으며, 고형분 함량은 25.51%이었고, 고형분에 대한 조단백, 조지방, 조회분, 염 함량은 각각 96.2%, 0.2%, 6.8%, 7.2%이었다. 실험 농도 설정을 위해 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 이용해 bicinchoninic acid (BCA) assay를 실시하여 탈염 참치 자숙액의 단백질 농도를 측정하였으며, 단백질 농도를 기준으로 0.1, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였다.

### 세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였으며, Kim et al. (2013)의 방법에 따라 DMEM (GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였다. 비장세포는 Ryu (2014)의 방법을 약간 변형하여 분리하였다. 먼저 세포 유리를 위해 BALB/c 마우스를 마취사 시킨 후, 비장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 비장은 RPMI 1640 배지로 세척한 후, tissue grinder로 균질화하여 세포를 유리시켰다. 세포 현탁액을  $4^\circ\text{C}$ , 1,800 rpm에서 5분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)한 후, red blood cell lysis buffer에 10분간 정치시켜 적혈구를 제거하였다. 그 후 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 첨가하여 RAW 264.7 세포와 동일한 조건으로 배양하였다.

### 세포 독성 측정

참치 자숙액 농축물의 세포독성을 알아보기 위해 Park et al. (2006b)의 방법을 변형하여 MTT assay를 실시하였다. 먼저 RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 96-well plate에 분주하고 20시간 동안 전 배양 후, 시료를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )로 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 22시간 배양하였다. 또한 비장세포의 경우  $1 \times 10^7$  cells/mL의 농도로 96-well plate에 분주하고 시료를 농도별로 첨가한 후  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 70시간 배양하였다. 배양 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 5 mg/mL 농도로 첨가하여 2시간 재 배양하고 이를  $4^\circ\text{C}$ , 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 생성된 formazan의 용해를 위해 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도[optical density (O.D.)]를 측정하였으며, 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation Index (\%)} = \frac{\text{sample 흡광도}}{\text{control 흡광도}} \times 100$$

## 배양 상층액의 cytokine 측정

참치 자숙액 농축물이 각 세포의 cytokine 분비에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RAW 264.7 세포 및 마우스 비장세포에 시료를 처리하여 배양 상층액의 cytokine 함량을 측정하였다(Seo and Shin, 2012). 먼저 RAW 264.7 세포를  $2.5 \times 10^5$  cells/mL로 24-well plate에 접종하고 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 18시간 동안 배양하였다. 마우스 대식세포에 시료를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL)로 처리하여 12시간 재 배양하였다. 비장세포의 경우  $2 \times 10^6$  또는  $5 \times 10^6$  cells/mL로 48-well plate에 접종하고 시료를 처리하여 72시간 배양하였다. 배양 상층액 내의 cytokine의 분비량은 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 측정하였다. ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12 (p70) 및 IL-1 $\beta$ 를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시키고, 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척한 후 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 각각의 biotinylated anti-mouse detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1 $\beta$ 의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1 $\beta$  detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응 시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 종료시킨 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 통계처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test법에 따라  $P < 0.05$  수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 대식세포 증식에 미치는 효과

대식세포는 탐식세포라고도 하며, 체내 모든 조직에 분포하여 면역계에서 매우 중요한 역할을 담당하는 세포이다. 정상 상태보다 체외의 bacteria나 virus에 의하여 활성화 되었을 때 잠재적 병원체를 제거하는데 더욱 효율적으로 작용하며, 대표적으로 식세포 작용(phagocytosis)과 면역 매개물질(inflammatory mediator)을 분비하고, T cell의 활성화 기능을 한다(Park et al., 2012). 이 외에도 활성화된 대식세포가 분비하는 세포독성 유발 단백질은 암세포, 바이러스 감염세포, 세균 등을 제거하는 기능을 함과 동시에 antigen-presenting cell (APC)로써 세포 표면에 class II MHC protein을 발현함으로써, Th cell과 상호 활성

화를 일으킨다(Park, 2008). 따라서 시료의 면역활성능을 측정하는 다수의 연구에서 대식세포의 증식능에 대한 시료의 효과를 측정하고 있다(Kim et al., 2011). 본 연구에서는 MTT assay를 이용하여 참치 자숙액 농축물의 처리 농도에 따른 RAW 264.7 세포의 생존률을 측정하였다. 그 결과(Fig. 1), 참치 자숙액 농축물을 단백질 농도 기준으로 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 µg/mL)로 처리 시 모든 처리 농도에서 무처리구에 비해 세포 증식률이 증가함을 보여 세포 독성을 가지지 않고 대식세포의 증식능을 농도 의존적으로 활성화시키는 것을 확인하였으며, 이는 Kim et al. (2011)의 연구 결과와 동일하였다. 따라서 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에 대하여 참치 자숙액 농축물을 단백질 농도 기준으로 100 µg/mL로 처리시까지 세포독성을 가지지 않는 것을 확인하여 이후의 실험에서 단백질 농도 기준으로 100 µg/mL까지 시료를 처리하여 실험을 진행하였다.

### 대식세포 cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 분비 변화

참치 자숙액 농축물이 대식세포를 자극하여 cytokine의 분비에 관여하는지 알아보기 위해 mouse 단핵구 기원의 RAW 264.7 cell line을 이용하여 참치 자숙액 농축물에 의한 cytokine의 분비 변화를 측정하였다. 그 결과, 세가지 cytokine 모두 참치 자숙액 농축물의 첨가에 따라 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 경우(Fig. 2A, B), 시료를 처리하지 않은 control 세포에서는 분비를 보이지 않았으나 참치 자숙액 농축물의 처리에 의해 농도 의존적인 증가를 보였으며, 특히 100 µg/mL 농도에서는 각각  $106.49 \pm 4.76$  pg/mL,  $303.50 \pm 4.71$  pg/mL로 현저한 증진 효과를 가지는 것으로 나타났다. 다음으로 IL-1 $\beta$ 의 경우(Fig. 2C), control에서는 낮은 분비량을 보였으나, 시료를 100 µg/mL 농도로 처리 시 2

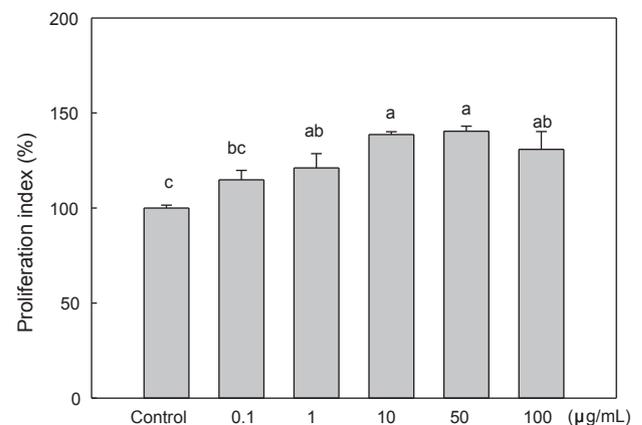


Fig. 1. Effect of concentrates of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice on the proliferation of RAW 264.7 cells. <sup>a-c</sup>Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Proliferation index (%) = (sample O.D./control O.D.) $\times 100$

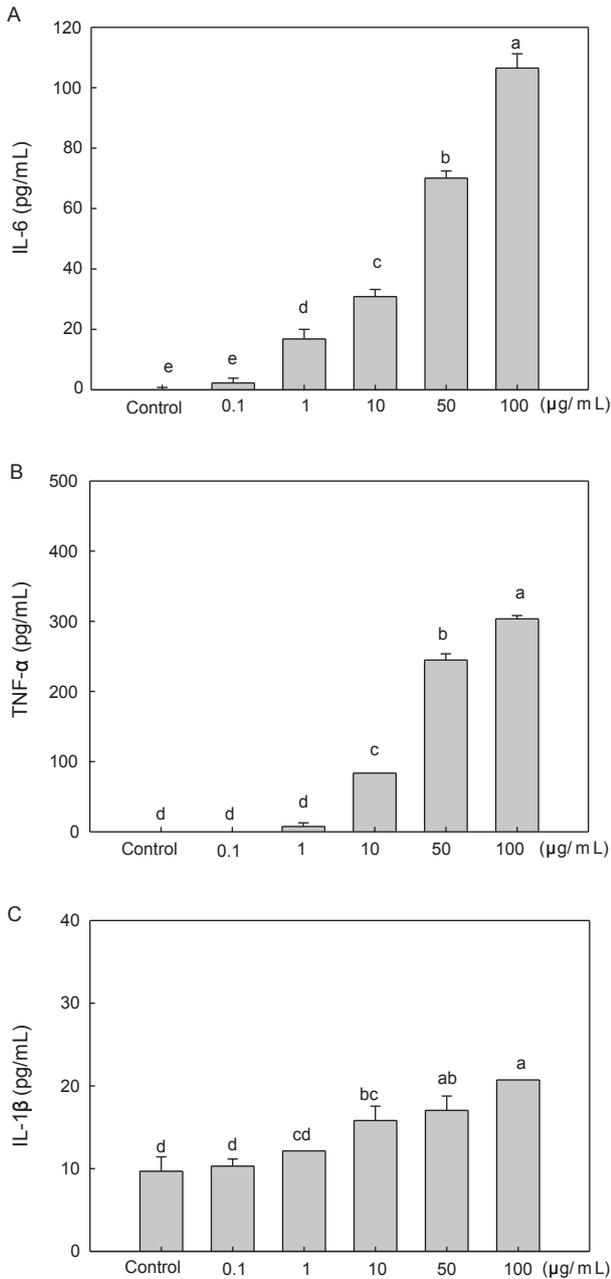


Fig. 2 Enhancing effects of concentrates of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice on the production of IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), and IL-1 $\beta$  (C) of RAW 264.7 cells. <sup>a-e</sup>Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

배 이상의 증진 효과를 보였다. 대식세포로부터 생산되는 염증성 cytokine 중 IL-6는 염증을 유발하여 대식세포를 포함하는 식세포(phagocytes)의 탐식작용 및 보체 생산을 증가시키는 역할을 하며(Inatsu et al., 2009), TNF- $\alpha$ 의 경우 대표적인 multi-functional cytokine으로 IL-1 $\beta$ 와 함께 작용하여 면역세포들을 염증 부위로 모이게 하고, T 세포의 분화와 증식에 관여하는 역

활을 한다(Knutson and Disis, 2005; Weis et al., 2007). 본 연구와 동일하게 시료의 대식세포의 활성화를 통해 면역증진능을 보고한 결과로는 Seo and Shin (2012)의 연구에서 천년초 유래 점질 다당이 대식세포를 자극하여 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 분비를 증가시킨다고 보고한 바 있으며, Cho et al. (2014)은 막걸리에서 분리한 다당이 대식세포의 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 에 대한 증진 효과를 가짐을 보고한 바 있다. 또한 Kim et al. (2006)은 상항버섯 추출물이 IL-6 및 IL-1 $\beta$ 에 대해, Yu et al. (2012b)은 영지버섯 다당이 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 에 대해 증진 효과를 가져 대식세포를 활성화시켜 면역 증강 효과를 가진다고 보고하였다. 따라서 본 연구 결과를 통해 참치 자숙액 농축물이 면역반응의 개시단계인 대식세포와 같은 선천면역계(innate immune system)를 직접 활성화시켜 IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 와 같은 cytokine의 생산을 증가시키는 것을 확인하였다.

### 비장세포 증식에 미치는 효과

비장은 혈액으로부터 항원을 수집하고, T 및 B cell의 성숙과 항원으로부터 자극을 받은 후 이들의 분열 및 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 비장 세포의 증식은 면역 시스템 활성화에 매우 중요한 의미를 가진다(Seo and Shin, 2012). 본 연구에서 마우스 비장세포의 증진능에 대한 참치 자숙액 농축물의 효과를 살펴보기위해 참치 자숙액 농축물을 단백질 농도 기준으로 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )로 처리한 후 MTT assay를 통하여 증진능을 관찰하였다. 그 결과(Fig. 3), 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 세포독성을 가지지 않고 농도 의존적으로 유의적인 증가를 보여 면역 활성능을 가지는 것을 확인하였다. Choi et al. (2008)은 장미무당버섯에서 분리한 조다당류가 비장세포의 수를 대조군에 비해 약 2배 증가시켰으며, Jin (1996)은 잣나무버

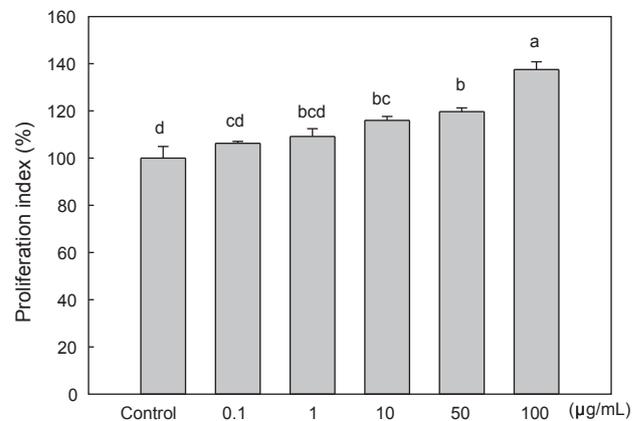


Fig. 3. Effect of concentrates of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice on the proliferation of mice splenocytes. <sup>a-d</sup>Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). Proliferation index (%) = (sample O.D./control O.D.) $\times$ 100

섯의 lepidan이 비장세포를 약 10배 증가시켜 면역증진능을 가지는 것으로 보고한 바 있다. 본 연구에서 참치 자숙액 농축물이 비장세포를 자극하여 증식능을 증가시킴을 확인하였으며, 또한 100 µg/mL 농도까지 세포 독성을 가지지 않는 것을 확인하여, 이후의 참치 자숙액 농축물의 처리에 따른 비장세포 Th1 및 Th2 cytokine의 분비 변화에 대해서는 단백질 농도 기준으로 100 µg/mL 농도까지 실험을 진행하였다.

#### 비장세포의 Th1 cytokine (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-12) 분비 변화

IFN-γ, TNF-α, IL-2 및 IL-12는 초기염증반응에서 세포 간 신호전달을 수행함으로써 면역반응에서 중요한 역할을 담당하며 (Barnes and Liew, 1995; Ryu, 2010), 따라서 많은 식품의 면역작용을 살펴보는 연구에서 면역증진능을 나타내는 지표로 활발히 이용되고 있다 (Brubaker et al., 1996), 따라서 본 연구에서 참치 자숙액 농축물이 세포수준에서 면역증강 효과를 가지

는지를 판단하기 위하여 마우스 비장세포의 helper T 세포가 분비하는 Th1 cytokine인 IFN-γ, TNF-α, IL-2 및 IL-12의 분비량을 ELISA assay kit로 측정하였다. 참치 자숙액 농축물을 농도별로 비장세포에 처리한 결과, IFN-γ, TNF-α, IL-2 및 IL-12 (p70)의 cytokine대해 농도 의존적 증가를 보였다. IFN-γ의 경우 (Fig. 4A), control구에서 66.68 ± 2.90 pg/mL의 분비량을 보였으나, 100 µg/mL로 처리하였을 때 125.62 ± 6.79 pg/mL으로 약 1.8배의 분비 증가를 보임을 확인하였다. IFN-γ는 Th1에서 생성되는 전염증성 사이토카인의 일종으로, 거의 모든 세포를 표적기관으로 하여 분비되며, 대식세포에 대하여 강력한 활성화 기능을 가진다 (Sypek et al., 1993). 또한 다양한 antigen presenting cells (APCs)에서 MHC class I 과 II의 발현을 유도하고, NK 및 T cell의 분화를 촉진시키며 호중구와 혈관내피세포를 활성화시킨다 (Lee et al., 2013). 이외에도 IL-4 및 IL-10을 억제하는 기능을 가짐으로써 체내의 Th1 세포 우세 반응인 type-1 response와 Th2 세포 우세 반응인 type-2 response간의

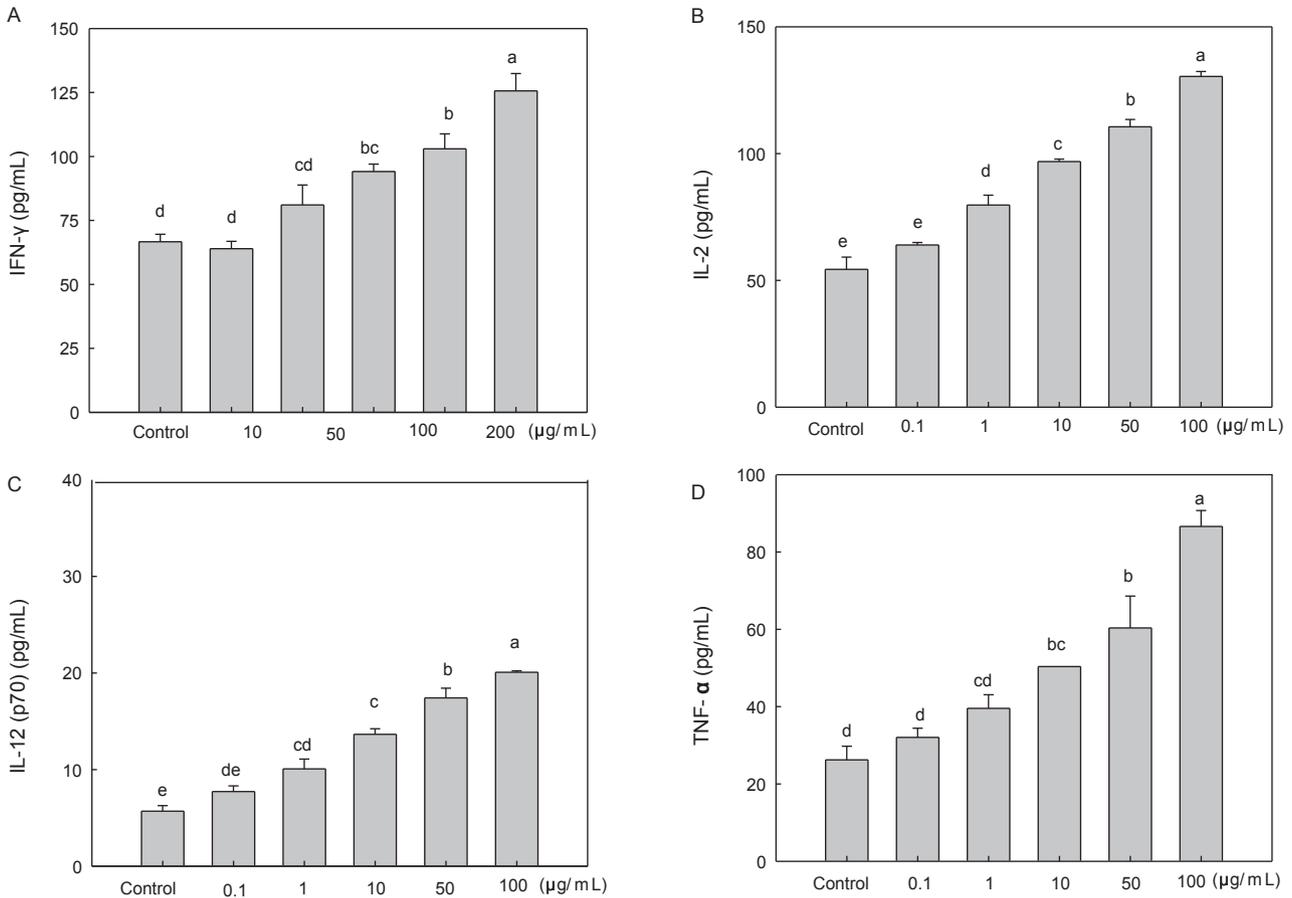


Fig. 4. Enhancing effects of concentrates of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice on the production of Th1 cytokines such as IFN-γ (A), IL-2 (B), IL-12(p70) (C), and TNF-α (D) on mice splenocytes. <sup>a-e</sup>Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

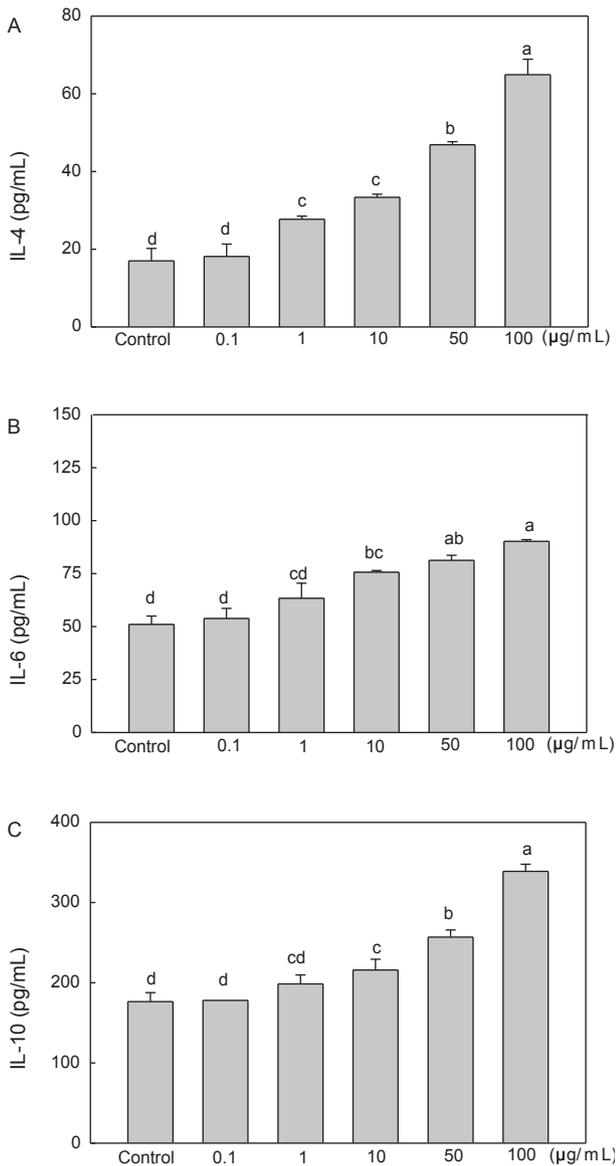


Fig. 5. Enhancing effects of concentrates of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice on the production of Th2 cytokines such as IL-4 (A), IL-6 (B), and IL-10 (C) on mice splenocytes. <sup>a-d</sup>Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

세포면역 항상성 유지여부를 판단하는 주요한 척도로 이용되고 있다(Pisa et al., 1992). 다음으로 IL-2 및 IL-12 (p70)의 경우(Fig. 4B, C), control에 비해 100 µg/mL으로 처리 시 각각 2.4 및 3.5배의 증진 효과를 보였다. IL-2는 활성화된 T 세포에서 분비되며, 주로 세포분열을 증진시켜 T cell growth factor로 작용하는 cytokine으로(Grabstein et al., 1994; Howard et al., 1994), IL-2의 증가 효과를 통해 T 림프구의 증가를 확인할 수

있는 지표가 된다(Ryu et al., 2010). 또한 IL-12는 p35와 p40의 소단위가 하나의 이황화 결합으로 결합된 헤테로이합체 단백질(p70)로 대식세포와 수지상세포 및 Th1 cell에서 분비되는 사이토카인이며, NK 및 T cell을 자극하여 IFN- $\gamma$ 의 분비를 증가시키는 역할을 하여 종양의 성장이나 전이를 억제하는 기능을 한다(Waldner and Neurath, 2009). 다음으로 TNF- $\alpha$ 의 경우(Fig. 4D), 100 µg/mL의 농도에서 약 3.3배의 분비 증가 효과를 보여 참치 자숙액 농축물의 비장세포의 TNF- $\alpha$  분비 증진능이 매우 우수함을 확인하였다. 이러한 TNF- $\alpha$ 는 전신성 염증과 급성 반응을 조절하는 cytokine으로 활성화된 대식세포 이외에도, CD4+ T cell이나 natural killer (NK) cell에서도 생성되어 면역세포를 조절하는 주요 cytokine이며, 특히 T cell과 상호 작용하여 T cell의 활성화와 성숙을 조절한다(Beutler et al., 1985; Carswell et al., 1975; Ryu, 2014). 이들 Th1 cytokine의 분비는 주로 자연면역에 의해 활성화되며(Seo et al., 2013), 그 중 특히 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2는 T cell의 성장인자로, 특히 TNF- $\alpha$ 는 대식세포와 같은 백혈구를 유도해 급성염증반응과 적응면역역반응의 주요 연결체로 작용하여 자연면역과 적응면역의 매개반응을 조절하는 것으로 알려져 있다(Asadulah et al., 2003). 위 결과에 따라서 참치 자숙액이 비장세포의 Th1 cytokine의 분비를 증가시키는 효과를 가짐을 확인하였다. 이와 같은 결과로 Ha et al. (2006)은 BALB/c 마우스 비장세포에 동충하초물 추출물을 처리한 경우 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2와 같은 Th1 cytokine과 동시에 IL-10에 대해서도 증진 효과를 가진다고 보고하였고, Choi et al. (2010)은 노루궁뎅이 자실체의 조다당류가 비장세포의 TNF- $\alpha$  및 IL-2에 증진 효과가 있다고 보고하였다. 또한 Seo et al. (2013)은 발효꾸지뽕 열매 추출물이 마우스 비장세포의 IL-2 및 IL-4에 대하여 증진 효과가 있다고 보고하였으며, Kim et al. (2012)은 동충하초 추출물을 마우스에 투여하였을 때, 비장세포에서 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 및 IL-12의 분비가 증가됨을 보고하였고, Cha et al. (2011)은 신령버섯의 조다당류를 투여한 생쥐의 비장세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-2가 현저히 증가함을 확인하여 면역 증진 효과를 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 이러한 Th1 cytokine에 대하여 현저한 증진 효과를 가져 참치 자숙액이 세포성면역력을 증진시키는 것을 확인하였다.

### 비장세포의 Th2 cytokine (IL-4, IL-6, IL-10) 분비 변화

Th2 cell은 항체에 의한 체액성 면역에 주로 작용하며, Th1 cell의 작용을 억제하는 기능을 한다. 이러한 작용을 하는 Th2 cytokine에는 IL-4, IL-6, IL-10이 있으며, 면역계는 이러한 Th1/Th2 cell의 균형에 의해 항상성을 가지며 유지된다(Seo et al., 2013). 따라서 본 연구에서는 참치 자숙액 농축물의 면역조절작용 메커니즘을 이해하기 위해, Th2 cytokine의 분비에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과(Fig. 5), 모든 cytokine이 참치 자숙액 농축물의 첨가 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였

다. 먼저 IL-4의 경우(Fig. 5A), control구 17.01 ± 3.19 pg/mL에 비해, 시료를 100 µg/mL로 처리 시 64.91 ± 3.99 pg/mL으로 약 3.81배의 증진 효과를 보였으며, IL-6의 경우(Fig. 5B) 1.7배, IL-10의 경우(Fig. 5C) 1.9배의 증진 효과를 가짐을 확인하였다. 본 연구에서 살펴본 Th2 cytokine 중 IL-4는 T 및 B cell과 NK cell, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 혈관내피세포, 섬유아세포를 표적세포로 하여 Th2 cell의 분화와 증식을 유도함과 동시에 CD4+ T cell의 발현을 증가시키는 cytokine이며(Seo et al., 2013), IL-6은 T cell 및 대식세포에서 분비되는 cytokine으로, 외부 침입인자에 의한 인체 감염 시 감염에 의한 숙주의 면역반응을 촉진하여 손상된 조직을 복구하는 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, B cell의 성장인자로 작용한다(Cho et al., 2014; Ha et al., 2006). 마지막으로 IL-10은 단핵구, 대식세포, T 및 B cell, NK cell, mast cell을 표적세포로 하며 특히 T cell과 대식세포에 직접적으로 작용하여 세포의 활성화를 억제하는 항염증성 cytokine (anti-inflammatory cytokine)으로(Lee et al., 2013), 주로 면역반응을 진정시켜 면역계에 대한 억제 기능을 담당하는 억제성 cytokine의 역할을 하며(Sohn et al., 2012), 위의 결과로부터 참치 자숙액이 IL-4 및 IL-6의 분비를 증가시킴으로써 T 및 B cell로 일어나는 세포성 및 체액성 면역반응을 활성화시키고, IL-10의 분비를 증가시켜 과도하게 일어나는 면역 반응에 대한 억제 및 조절 효과를 가짐으로써 면역 작용을 조절하는 데 탁월한 효과가 있는 것으로 사료된다. 이와 동일한 결과로, Kim et al. (2012)은 동충하초 추출물을 마우스에 투여하였을 때, 비장세포에서 IL-10의 분비가 증가됨을 보고하였고, Seo et al. (2013)은 흑마늘 추출물이 마우스 비장세포에서 IL-4 및 IL-6의 생성을 유도하여 B cell의 성장을 유도하고 T cell의 활성을 조절함으로써 면역 증진 작용을 가진다고 보고하였다. 위의 결과를 종합해 볼 때, 참치 자숙액이 대식세포를 자극하여 선천면역계를 활성화시키고 동시에 비장세포의 helper T cell에 의한 적응면역반응을 활성화시켜 Th1/Th2 cell의 균형 조절에 의해 일어나는 면역 작용을 증진시키는 것으로 사료되며, 따라서 본 연구 결과를 기초로 이용률이 저조했던 참치가공 부산물인 자숙액을 이용하여 다양한 건강 기능성 제품 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## 사 사

이 논문은 2014년도 해양수산부 수산실용화기술개발사업에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## References

- Amirghofran Z, Azadbakht M and Karimi MH. 2000. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol* 72, 167-172. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00234-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00234-8).
- Asadulah K, Stery W and Volk HD. 2003. Interleukin-10 therapy- review of a new approach. *Pharmacol Rev* 55, 241-269. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.55.2.4>.
- Barnes PJ and Liew FY. 1995. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 16, 128-130. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80128-6](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(95)80128-6).
- Bergelson LD. 1995. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. *Immunol Today* 16, 483-486. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80032-8](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(95)80032-8).
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R and Cerami A. 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316, 552-554. <http://dx.doi.org/10.1038/316552a0>.
- Brubaker JO, Thompson CM, Morison LA, Knipe DM, Siber, GR and Finberg RW. 1996. Th1-associated immune responses to beta-galactosidase expressed by replication-defective herpes simplex virus. *J Immunol* 157, 1598-1604.
- Byun MW. 2012. Effect of gamma irradiation on the microbial safety and biological activities of tuna cooking juices. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 27, 222-226. <http://dx.doi.org/10.7841/ksbj.2012.27.4.222>.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N and Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 3666-3670. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.72.9.3666>.
- Cha YJ, Kim JH, Lee TS and Lee UY. 2011. Antitumor and immuno-potentiating activities of crude polysaccharide from fruiting body of *Agaricus brasiliensis*. *Korean J Mycol* 39, 57-67. <http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2011.39.1.057>.
- Cho JW, Rhee YK, Lee YC, Kim YC, Shin KS, Nam SH and Hong HD. 2014. Immunomodulatory activity of crude polysaccharides from *Makgeolli*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43, 238-242. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.2.238>.
- Choi YI, Lee JS, Lee UY and Lee TS. 2010. Immuno-stimulating and antitumor effects on mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus*. *J Life Sci* 20, 623-631. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2010.20.4.623>.
- Choi YI, Lee KW, Hur H, Lee UY and Lee TS. 2008. Immuno-potentiating and antitumor effects against mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Russula rosacea*. *Kor J Mycol* 36, 84-92. <http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2008.36.1.084>.
- Fahey TJ and Myers WP. 1975. Documented hyperparathyroidism of thirty-six years' duration. *Cancer* 35, 803-807.
- Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M, Johnson L, Alderson MA, Watson JD, Anderson DM and Giri JG. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264, 965-968. <http://dx.doi.org/10.1126/science.8178155>.
- Ha JW, Yoo HS, Shin JW, Cho JH, Lee NH, Yoon DH, Lee YW,

- Son CG and Cho CK. 2006. Effects of *Cordyceps militaris* extract on tumor immunity. *Kor J Ori Med* 27, 12-29.
- Han SB, Kim YH, Lee CW, Park SM, Lee HY, Ahn KS, Kim IH and Kim HM. 1998. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacol* 40, 39-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0162-3109\(98\)00026-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0162-3109(98)00026-5).
- Hancock REW and Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptide in innate host defences. *Trends Microbiol* 8, 402-410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01823-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01823-0).
- Howard B, Burrascano M, McCallister M, Chong K, Gangavalli R, Severinsson L, Jolly DJ, Darrow T, Vervaert C, Abdel-Wahab Z, Siegler HF and Barber JR. 1994. Retrovirus-mediated gene transfer of the human  $\gamma$ -IFN gene: a therapy for cancer. *Ann N Y Acad Sci* 716, 167-187. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21711.x>.
- Hwang JS. 2010. Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice. *Food Res Intr* 43, 902-906. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.012>.
- Inatsu A, Kinoshita M, Nakashima H, Shimizu J, Saitoh D, Tamai S and Seki S. 2009. Novel mechanism of C-reactive protein for enhancing mouse liver innate immunity. *Hepatology* 49, 2044-2054. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22888>.
- Jang JR, Kim KK, Mun SB and Lim SY. 2009. In vitro anticancer and antioxidant effect of solvent extracts from tuna dried at low temperature vacuum. *J Life Sci* 19, 633-638. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2009.19.5.633>.
- Jin ML. 1996. A study on the activation of immune cell and transcription factor of pine nut mushroom. Ph. D. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
- Kim DJ, Ryu SN, Kim HY, Kim JH and Hong SG. 2011. In vivo immunological activity in fermentation with black rice bran. *Korean J Food Nutr* 24, 273-281. <http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2011.24.3.273>.
- Kim GY, Lee JY, Lee JO, Ryu CH, Choi BT, Jeong YK, Lee KW, Jeong SC and Choi YH. 2006. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 1218-1226. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70.1218>.
- Kim HJ, Lee TH, Kwon YS, Son MW and Kim CK. 2012. Immunomodulatory activities of ethanol extract of *Cordyceps militaris* in immunocompromised mice. *J Korean Soc Sci Nutr* 41, 494-500. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.4.494>.
- Kim JS, Heu MS and Yeum DM. 2001. Component characteristics of canned oyster processing waste water as a food resource. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30, 299-306.
- Kim KH, Choi MW and Lim SY. 2013. Effect of tuna extract on production of nitric oxide and inflammatory cytokines. *Korean J Food Sci Technol* 45, 385-390. <http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.2013.45.3.385>.
- Knutson KL and Disis ML. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54, 721-728. <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-004-0653-2>.
- Lasek W, Feleszko W, Golab J, Stokłosa T, Marczak M, Dabrowska A, Malejczyk M and Jakóisiak M. 1997. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. *Cancer Immunol Immunother* 45, 100-108.
- Lee HS, Kim HJ, Choi JI, Kim JH, Kim JG, Chun BS, Ahn DH, Chung YJ, Kim YJ, Byun MW and Lee JW. 2008. Antioxidant activity of the ethanol extract from cooking drips of *Thunus thynnus* by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37, 810-814. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.6.810>.
- Lee JW, Jang MH, Choi JS and Ahn TW. 2013. The effect of Yongyukjowitang distillate on the immune activity of spleen cells of aged rats. *J Sasang Constitut Med* 25, 218-232. <http://dx.doi.org/10.7730/JSCM.2013.25.3.218>.
- Liblau RS, Singer SM and McDevitt HO. 1995. Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16, 34-38. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80068-9](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(95)80068-9).
- Mosmann TR and Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 7, 145-173. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>.
- Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yermeev W and Moroz AM. 1996. Influence of the mouse *Bcg*, *Tbc-1* and *xid* genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clin Exp Immunol* 104, 37-43.
- Oettgen HF. 1990. Biological agents in cancer therapy: cytokines, monoclonal antibodies and vaccines. *J Cancer Res Clin Oncol* 116, 116-119. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-643.x>.
- Oh HS. 2007. Preparation and utilization of functional sauce from seafood cooking drip. MS Thesis. Gyeongsang National University, Jinju, Korea.
- Oldham RK. 1985. Biologicals and biological response modifiers: new approaches to cancer treatment. *Cancer Invest* 1, 53-70.
- Park HY, Lee MS, Jo SY, Won HS, Lee HS, Lee H and Shin KS. 2012. Immuno-stimulating activities of polysaccharides isolated from commercial soy sauce and traditional Korean soy sauce. *Korean J Food Sci Technol* 44, 228-234. <http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.2.228>.
- Park HY, Lim CW, Kim YK, Yoon HD and Lee KJ. 2006a. Immunostimulating and anticancer activities of hot water extract from *Capsosiphon fulvescens*. *J Korean Soc Appl Bio*

- Chem 49, 343-348.
- Park W. 2008. Study on biological effect of multi-herbal drug KOCO-P1 on mouse macrophage raw 264.7 cells. Korean J Herbal 23, 151-157.
- Park YM, Won JH, Yun KJ, Ryu JH, Han YN, Choi SK and Lee KT. 2006b. Preventive effect of Ginkgo biloba extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells. Biol Pharm Bull 29, 985-990. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.29.985>.
- Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Buchi A, Gerdin B and Kiessling R. 1992. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. Proc Natl Acad Sci USA 89, 7708-7712. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.16.7708>.
- Rengarajan J, Szabo SJ and Glimcher LH. 2000. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. Immunol Today 21, 479-483. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01712-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01712-6).
- Ryu DS, Oh SM, Kim KH, Kim SH, Choi HJ and Lee DS. 2010. Immunomodulating activity of *Laminaria japonica* polysaccharides. Korean J Food Sci Technol 42, 350-354.
- Ryu HS. 2010. Effects of water extract *Acorn* on mouse immune cell activation *ex vivo*. Korean J Food Nutr 23, 135-140.
- Ryu HS. 2014. Enhancing effect of *Pleurotus ostreatus* extracts on mouse spleen and cytokine cells activation. Korean J Food Nutr 27, 603-608. <http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2014.27.4.603>.
- Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Ryu EJ, Joo WH, Kim KH and Jeong YK. 2013. Effect of black garlic extract on cytokine generation of mouse spleen cells. J Life Sci 23, 63-68. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2013.23.1.63>.
- Seo SY, Pang JY, Li RH, Kwon J, Ahn MS and Eun JS. 2009. Effects of the combined extracts of *Glycine max* Merr. and *Glycyrrhiza uralensis* on the activity of murine splenocytes and macrophages. Korean J Oriental Physiol Pathol 23, 1385-1391.
- Seo YS and Shin KS. 2012. Immune system-stimulating activities of mucilage polysaccharides isolated from *Opuntia humifusa*. J Korean Soc Food Sci Nutr 41, 95-102. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.1.095>.
- Shiau CY and Chai T. 1990. Characterization of oyster shucking lipid wastes and their utilization as oyster soups. J Food Sci 55, 374-378. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06767.x>.
- Sohn EH, Yoon JW, Koo HJ, Park DW, Jeong YJ, Namkoong S, Han HS and Kang SC. 2012. Immunomodulating effects of red ginseng on the regulation of cytokine release *in vivo*. Korean J Plant Res 25, 578-585. <http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2012.25.5.578>.
- Sypek JP, Chung CL, Mayer SH, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF and Schaub RG. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. J Exp Med 177, 1797-1802.
- Waldner MJ and Neurath MF. 2009. Gene therapy using IL-12 family members in infection, auto immunity, and cancer. Curr Gene Ther 9, 239-247. <http://dx.doi.org/10.2174/156652309788921099>.
- Weiss JM, Subleski J, Wigginton JM and Wiltrout RH. 2007. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. Expert Opin Biol Ther 7, 1705-1721. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.7.11.1705>.
- Yoon TJ. 2008. Effect of water extracts from root of *Taraxacum officinale* on innate and adaptive immune responses in mice. Korean J Food Nutr 21, 275-282.
- Yu AR, Park HY, Kim YS, Ha SK, Hong HD and Choi HD. 2012a. Immuno-enhancing effect of seed extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. J Korean Soc Food Sci Nutr 41, 1671-1676. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.12.1671>.
- Yu Q, Nie SP, Li WJ, Zheng WY, Yin PF, Gong DM and Xie MY. 2012b. Macrophage immunomodulatory activity of a purified polysaccharide isolated from *Ganoderma atrum*. Phytother Res 27, 186-191. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4698>.