

ARTICLE

환형동물(지렁이) 열수 추출물의 면역활성 효과

김 광 옥 · 변 의 홍\*

공주대학교 식품공학과

Immunological Activity of Annelida (*Lumbricus rubellus*) Water Extracts

Kwangwook Kim, Eui-Hong Byun\*

Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

Received: September 13, 2019  
 Revised: November 7, 2019  
 Accepted: December 6, 2019

\*Corresponding author :  
 Eui-Hong Byun  
 Department of Food Science and  
 Technology, Kongju National  
 University, Yesan 32439, Korea.  
 Tel : +82-41-330-1481  
 E-mail : ehbyun80@kongju.ac.kr

Copyright © 2019 Resources Science  
 Research Institute, Kongju National University.  
 This is an Open Access article distributed  
 under the terms of the Creative Commons  
 Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>)  
 which permits unrestricted non-commercial  
 use, distribution, and reproduction in any  
 medium, provided the original work is  
 properly cited.

ORCID

Kwangwook Kim  
<https://orcid.org/0000-0002-7200-871X>  
 Eui-Hong Byun  
<https://orcid.org/0000-0003-0220-7630>

Abstract

This present study was to demonstrate the immunological effect of annelida (*Lumbricus rubellus*) water extract on various immune cell models (bone-marrow derived macrophage and mouse splenocyte). Annelida water extracts are treated in the bone-marrow derived macrophage (BMDM) and splenocyte from mouse, and it was not found the cytotoxicity in dose below than 250 µg/mL. Cytokine (Tumor necrosis factor alpha; TNF-α, Interleukin-6; IL-6, Interleukin-1β; IL-1β) production activity tested in the BMDM was significantly increased by treatment of annelida water extracts. Cell surface marker (CD 80/86) mediated with immune cell activation was highly increased by treatment of extracts. Similarly, cytokine production activity in splenocyte, annelida water extracts treatment significantly increased the Th1 type of cytokines (Interferon-γ; IFN-γ) production, but not affected the Th2 type cytokines (Interleukin-4; IL-4) production. Therefore, these results suggest that water extract from annelida may be a powerful candidates for maintaining the immune system.

Keywords

*Lumbricus rubellus*, Immune enhancing activity, Macrophage, Splenocyte, Cytokine production

1. 서론

면역반응은 항원에 대한 특이성에 따라 선천성 면역반응과 후천성 면역반응으로 구분되며, 선천성 면역반응은 주로 탐식세포(대식세포 및 수지상세포)들에 의해서 이루어지며, 항원 특이적인 반응을 수반하지 않는다(Cannon, 2000). 후천성 면역반응은 주로 T 세포 및 B 세포에 의하여 이루어지며, 선천성 면역반응 후에 식세포에 의하여 제시되는 특이 항원을 인식하면서 면역반응이 개시되며, 면역 반응의 강도가 선천면역에 비하여 매우 큰 특징을 가지고 있다(Clerici and Shearer, 1994). 생체면역조절기능은 외부의 병원성 인자들로부터 자기를 보호하기 위한 일종의 자기 방어 시스템이며, 이러한 면역기능이 떨어질 경우 인체는 다양한 질병에 노출될 수 있다.

최근 급속한 경제성장과 의학기술의 발달로 인해 인간의 수명이 연장되고, 특히 식생활 습관의 변화로 인해 즉석 편의식품 섭취가 증가하면서, 성인병 및 면역관련 질환에 노출되는 빈도가 계속해서 증가되고 있는 추세이다(Cho et al., 2005). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 유용생물 자원들로부터 면역활성 물질들을 분리하는 연구가 선진국을 중심으로 세계 각국에서 활발하게 이루어지고 있는 추세이다(Byrd et al., 2000; Lee et al., 1998). 그러나 이러한 연구는 주로 한약재와 같은 식물군에 대하여 집중되어 왔으며, 유용 환형동물의 이용개발에 대해서는 전세계적으로도 그 관심도가 아주 낮은 형편이다.

한의학에서 환형동물 중 지렁이(*Lumbricus rubellus*) 추출물을 이용하여 심혈관 질병(Hori *et al.*, 1974)과 해열제(Liu *et al.*, 2013)로 많이 사용되어 왔다. 이전 연구에서 지렁이 조직에 다량 존재하는 폴리페놀산(polyphenolic)이 항염증 및 항산화 효과가 있다고 보고되었다(Balamurugan *et al.*, 2007). 또한, 지렁이 추출물을 이용하여 항응혈제 활성(anticoagulative activities)(Mihara *et al.*, 1992) 및 간기능보호 활성(hepatoprotective activity)(Balamurugan *et al.*, 2008)이 보고되었으며, 국내에서도 갯지렁이와 지렁이 추출물을 이용하여 항염증 및 항산화 활성 연구가 보고되었다(Kim *et al.*, 2016). 하지만 지렁이 추출물에 대한 연구가 아직도 많이 진행되지 않았으며, 특히 식품소재로서 면역활성에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 식품소재로서 비교적 가능성이 높은 환형동물이 갖는 약용생물자원으로서의 중요한 가치와 높은 이용가능성에 관하여 평가하기 위하여, 대식세포 및 비장세포 등의 다양한 면역세포에 지렁이 추출물을 처리하였을 때 나타나는 면역 활성 작용에 관하여 평가해 보았다.

## II. 재료 및 방법

### 실험재료 및 추출

본 실험에서 사용한 환형동물(지렁이)은 ㈜에스웍(Korea)으로부터 동결건조분을 구입하여 사용하였다. 동결건조된 환형동물을 실험용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Korea)로 분쇄한 분말 2 g에 증류수를 100 mL첨가하여 60°C에서 24시간 동안 가열하여 추출하였다. 원심분리기(Combi-514R, Hanil, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 분리하여 추출물로 사용하였다. 실험동물은 6주령(18-20 g)의 C57BL/6 웅성 마우스를 Orient사(Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 분양받은 마우스는 동물사육실 내부 환경에 1주간 순화시킨 후 미분화 골수 세포 및 비장세포를 채취하기 위하여 사용하였다.

### 골수세포로부터 대식세포로의 분화 유도

C57BL/6마우스로부터 골수 채취용 주사기(BD, USA)를 이용해 대퇴부 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 차가운 phosphate buffered saline(PBS; Invitrogen Co., USA)으로 3회 세척한 후, 적혈구를 제거하기 위하여 red blood cell(RBC) lysis buffer(Invitrogen Co., USA)를 5 mL 처리하여 10분간 방치하였다. PBS로 3번 세척하여 적혈구 찌꺼기를 완전히 제거하였다. 분리한 미분화 골수세포를 대식세포로 분화시키기 위하여 10% Fetal bovine serum(FBS; GIBCO, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM; Life Technology, USA)에 2 mM L-glutamin, 100 unit/mL penicillin/streptomycin, 50  $\mu$ M mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid, 1 mM sodium pyruvate, 25 ng/mL macrophage colony-stimulating factor(MC-SF; R&D System, USA)를 첨가하여 4일 동안 배양하였다.

### 대식세포의 세포 증식능

환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 세포 증식능(cell proliferation)에 미치는 영향에 관하여 측정하기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 대식세포를 각각 96 well plate에 well당  $3 \times 10^5$ 개로 분주한 후, 환형동물 열수 추출물을 62.5, 125, 250, 500, 1,000  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, MTT 방법에 의하여 세포 증식능을 평가하였다. MTT 방법은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT; Sigma Chemical Co., USA) 시약을 phosphate buffered saline(PBS; Invitrogen Co., USA)에 5 mg/mL의 농도로 용해하여 well당 30  $\mu$ L씩 첨가하고 2시간 동안 반응시켰다. 배양 상등액을 제거하고, 세포 내 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich, USA)에 녹인 후 microplate reader를 이용하여 흡광도 570 nm에서 측정하였다. 세포증식율은 Control(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 비교하였다.

### 대식세포의 사이토카인 분비능

환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스 골수세포로부터 분화된 대식세포를 48 well plate에 well당  $5 \times 10^5$ 개로 분주한 후, 농도별(62.5 및 125  $\mu$ g/mL) 환형동물 추출물을 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양 상등액에 포함되어있는 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ , interleukin(IL)-6, 및 IL-1 $\beta$ 의 함량을 측정하였다. 사이토카인의 함량은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(BD Biosciences, USA)를 사용한 후 microplate reader를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

### 대식세포의 세포 표면 활성 인자(Cell Surface Marker)에 미치는 영향

환형동물 추출물의 처리가 대식세포 표면 활성인자의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 마우스 골수세포로부터 분화된 대식세포를 각각 6 well plate에 well당  $1 \times 10^6$ 개로 분주한 후, 농도별(62.5 및 125  $\mu\text{g/mL}$ ) 처리한 후 24시간 동안 반응시키고, 각각의 세포를 회수하였다. 항체의 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 회수된 각각의 세포에 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 Fc $\gamma$  I/III(BD Biosciences, USA)을 처리하여 4°C에서 20분간 방치한 후, 대식세포와 수지상세포 표면 활성인자 분석을 위하여 anti-CD80-PE 및 anti-CD86-PE(BD Biosciences, USA)와 같은 세포 표면 항체를 각각 1,000배 희석하여 각각의 세포에 처리하고 30분 동안 방치한 후, 유세포 분석기(BD FACSVerse™; BD Biosciences)를 이용하여 환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 세포 표면 활성인자의 발현에 미치는 영향에 관하여 분석하였다. 분석 후에 나온 데이터는 FlowJo software(Tree Star, USA)를 사용하여 평가하였다.

### 마우스로부터 비장세포 분리

1주간의 순화를 마친 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 비장을 무균적으로 적출하여 10%의 FBS와 항생제 penicillin과 streptomycin (100 unit/mL, 100  $\mu\text{g/mL}$ )을 함유한 Roswell park memorial institute(RPMI)-1640(Life Technology) 배지로 세척한 후 tissue grinder(Corning costar, USA)로 균질화하여 비장세포를 유리시켰다. 세포현탁액에 적혈구를 제거하기 위하여 red blood cell(RBC) lysis buffer(BD Biosciences, USA)를 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 혈구계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다.

### 비장세포의 세포 증식능 평가

환형동물 추출물의 처리가 마우스로부터 분리한 비장세포의 증식능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여, 96 well plate에 well당  $1 \times 10^6$ 개의 비장세포를 분주한 후, 환형동물 열수 추출물을 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, WST-1®(Daeil Lap Science, Korea) 용액을 각각의 well에 10  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하고, 2시간 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하여 세포 증식능을 평가하였다. 비장세포 증식율은 Control(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 비교하였다.

### 비장세포의 대한 사이토카인 분비능 평가

환형동물 추출물의 처리가 비장세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여, 비장 조직으로부터 분리된 비장세포를 48 well plate에 well당  $2 \times 10^6$ 개씩 분주한 후, 농도별(125 및 250  $\mu\text{g/mL}$ ) 환형동물 추출물을 처리하여 각각 24시간 동안 반응시키고, 배양 상등액에 존재하는 사이토카인[interferon(IFN)- $\gamma$  및 interleukin(IL)-4]의 함량에 관하여 측정하였다. 사이토카인의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(eBioscience Co., USA)를 사용한 후 microplate reader를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

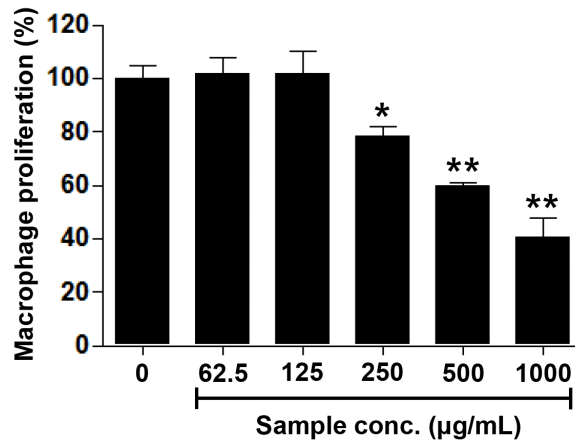
### 통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 통계학적 소프트웨어(GraphPad Prism Software, version 4.03; GraphPad Software, USA)를 사용하여 Tukey's multiple comparison test에 이어 one way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  및 \*\*\*  $p < 0.001$  수준에서 비교하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 세포 증식능에 미치는 영향

환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 세포 증식능에 미치는 영향에 관해 평가하기 위하여 C57BL/6 마우스로부터 미분화 골수 세포를 분리하여 대식세포로 분화시킨 후, 분화된 대식세포에 농도별(62.5, 125, 250, 500, 및 1,000  $\mu\text{g/mL}$ )로 추출물을 처리하였을 때의 대식세포의 세포 증식능을 Fig. 1에 나타냈다. 환형동물 추출물을 농도별로 처리한 결과, 지렁이 추출물 처리구에서 250  $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 유의적으로 대식세포에 독성이 관찰되었다. 본 연구 결과에서 지렁이 추출물의 처리구의 경우 고농도에서 세포독성을 나타내었는데, 이러한 세포독성을 나타내는 이유는 지렁이의 내부에 축적하고 있는 metallothioneins의 함량과 밀접한 관련을 갖는 것으로 사료되며, metallothionein은 금속(카드뮴, 아연, 구리)과 결합하는 단백질로서 다량의 중금속 성분을 축적할 수 있는 구조를 가지고 있기 때문에 세포 독성이 증가한 것으로 사료된다.



**Fig. 1. Macrophage proliferation activity of water extracts from annelida (*Lumbricus rubellus*).** The sample was treated at the concentration of 62.5, 125, 250, 500, and 1,000  $\mu\text{g/mL}$  in bone-marrow derived macrophages (BMDMs). The data shown are the mean  $\pm$  SD of at least three experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  was compared with un-treated sample group.

생체면역조절 기능이란 외부로부터 자기 자신을 보호하기 위해 사용되는 생물체의 자기방어 수단으로, 면역계는 침입한 항원에 대하여 활성화되는 각종 면역세포들의 작용으로 숙주를 방어한다(Kim *et al.*, 2005). 이러한 면역세포들의 증식, 분화 및 작용기전은 다양한 종류의 외부 자극에 의해 조절될 수 있다고 보고되고 있다(Kwon *et al.*, 2001; Suh, 1996). 이런 관점에서 질병상태는 면역 반응이 저하된 상태라고 전제하고, 암 환자 또는 노약자 등에서 면역능을 증진시킬 수 있는 물질을 추구하게 되었다. 다양한 인체의 면역세포들 중에서 외래 병원체가 생체로 유입되었을 때 가장 먼저 감지하는 세포가 탐식세포(phagocyte)이고, 이들은 선천면역체계의 중추적인 역할을 담당한다(Cha and Lim, 2014). 탐식세포의 주된 역할은 외래 항원의 감시 및 이동, 항원의 탐식 및 제거 등이 있으며, 항원제시세포로서 후천면역계를 매개하는 T 세포와 상호작용을 일으켜, T 세포의 활성을 돕고, 조절하는 역할을 수행하므로(Ripoll *et al.*, 2008) 탐식세포들의 활성을 조절하는 것은 면역관련 질병들의 예방 및 치료에 관한 무한한 가능성을 제시한다.

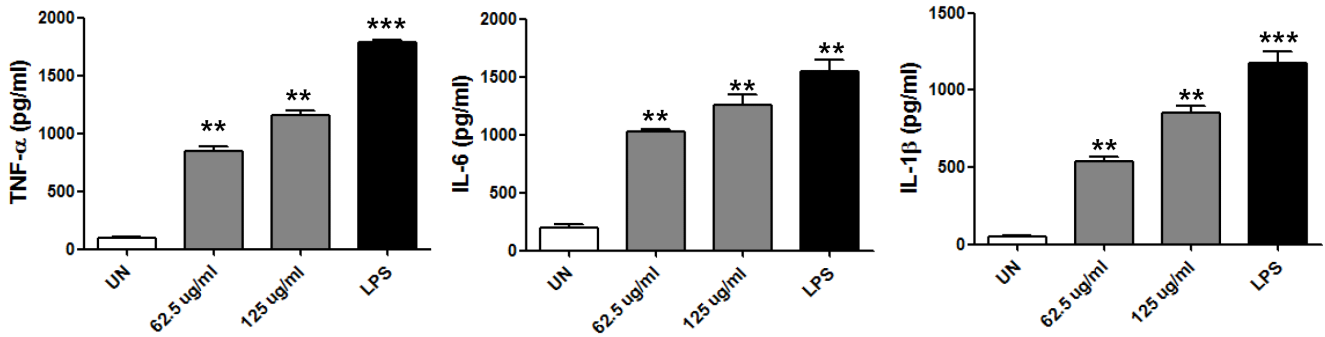
### 환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향

병원성 항원들이 인체 내 유입되면 다양한 면역세포가 자기방어 기작을 수행하기 위하여 활성화된다. 일차적으로 탐식세포(대식세포 및 수지상세포)들이 활성화되면서 부착성이 강해지며, 외부 바이러스나 세균에 오염된 세포를 직접적으로 탐식하여 사멸시키거나, 간접적으로 면역활성 물질인 사이토카인을 생산한다(Lee *et al.*, 2012). 사이토카인은 면역세포간의 상호협력을 증대하는 역할을 수행하며, 기타 외부에서 오는 여러 가지 자극에 대하여 한 개체의 세포와 조직들이 유기적으로 작용하도록 도와줄 뿐만 아니라, 조혈작용, 면역반응, 일반적인 염증과정 등을 조절하는 것으로 보고되어진다(Calixto *et al.*, 2004). 대식세포와 수지상세포가 생산하는 대표적인 사이토카인으로 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin(IL)-1 $\beta$  및 IL-6 등이 있으며(Calixto *et al.*, 2004), 이들은 대식세포의 활성화를 알아보기 위한 중요한 지표로 판단된다.

본 연구에서 환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 활성화에 미치는 영향에 관해 관찰하기 위하여 활성화된 대식세포의 주요한 지표 물질 중 대표적인 사이토카인 분비능 조절에 관하여 알아보았다. 지렁이 추출물 세포독성 평가시 250  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서 세포독성이 나타나는 것으로 판단되어 62.5 및 125  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 처리 농도별 사이토카인 분비능을 관찰하였다(Fig. 2). 또한, 양성 대조구로서 대식세포의 마이토젠(mitogen)인 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하여 환형동물 추출물과 결과를 비교하였다. 그 결과, 추출물 처리구에서 처리 농도가 증가할수록 사이토카인의 분비능이 농도 의존적으로 증가되는 것이 관찰되었다. 따라서 환형동물 추출물이 대식세포 활성화 지표물질인 사이토카인의 분비능을 상승시키는 것을 확인하였고, 이러한 환형동물 추출물이 대식세포 활성화에 주는 영향을 직접적으로 평가하기 위하여 대식세포 표면에 부착된 세포 표면 활성화인자(cell surface activation marker) 중 대표적으로 알려진 세포 표면 항원무리(cluster of differentiation (CD)) molecule의 발현에 관하여 관찰하였다.

### 환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 세포 표면 활성화인자에 미치는 영향

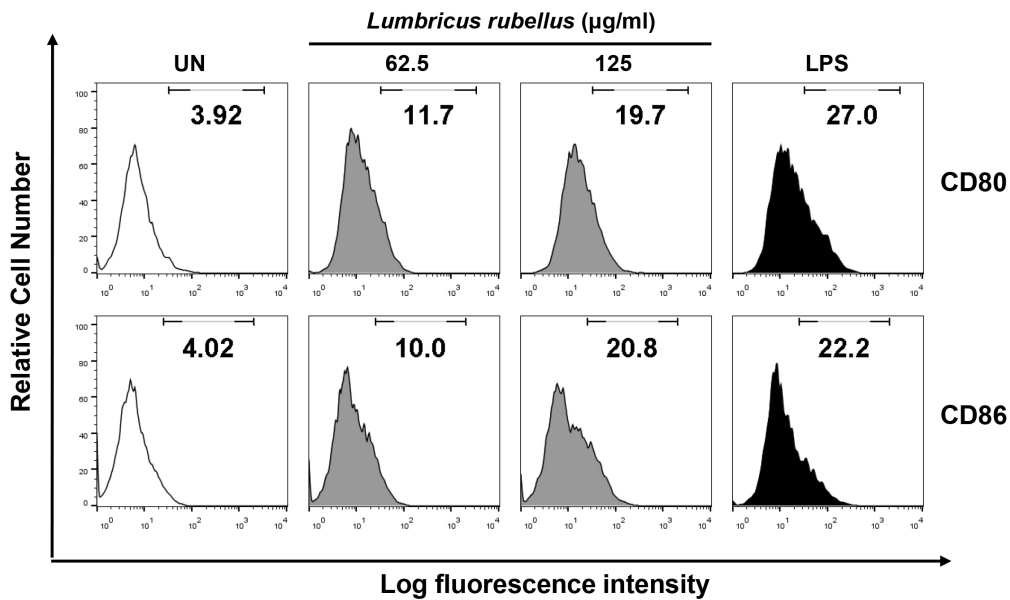
세포 표면 항원무리(cluster of differentiation (CD))는 세포 표면 분자를 식별하고 연구하기 위해 붙인 이름으로(Chan *et al.*, 1988), 다양한



**Fig. 2. Cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) production activity of water extracts from annelida (*Lumbricus rubellus*) in macrophage.** Extract was treated at the concentration of 62.5 and 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and LPS was also treated at the concentration 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in BMDMs. The data shown are the mean  $\pm$  SD of at least three experiments. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  was compared with un-treated sample group (UN).

면역세포를 분리 또는 분석할 수 있으며, 세포의 수용체나 수용체를 활성화하는 리간드로 작용하는 등 면역세포 활성화에 중요한 지표로 사용되고 있다(Kikuchi *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007).

본 연구에서는 환형동물 추출물의 처리가 대식세포의 세포 표면 활성화인자인 CD80 및 CD86의 발현에 미치는 영향을 유세포 분석기를 이용하여 알아보았다. 지렁이 추출물(62.5 및 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 및 LPS(0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 처리 농도별 CD 80, 86 발현 정도를 관찰하였다(Fig. 3). 그 결과, 대식세포의 표면 활성화 인자들의 발현이 처리 농도에 의존적으로 증가되는 것이 관찰되었다. 따라서 사이토카인의 분비능 증가(Fig. 2)와 세포 표면 활성화 인자의 발현 증가(Fig. 3)로 보아, 환형동물 추출물의 처리는 선천 면역세포인 대식세포의 활성화에 크게 기여하는 것으로 사료된다. 추후 이러한 면역활성 효과에 관하여 보다 면밀히 알아보기 위하여 적응면역계의 대표적인 기관인 비장(spleen)으로부터 비장세포(splenocyte)를 분리하여, 분리된 비장세포에 환형동물 추출물의 처리하여 비장세포의 세포증식 및 사이토카인 생성능에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다.



**Fig. 3. Cell surface marker (CD80/86) expression of water extracts from annelida (*Lumbricus rubellus*) in macrophage.** Extract was treated at the concentration of 62.5 and 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in BMDMs. The data shown are the mean  $\pm$  SD of at least three experiments.

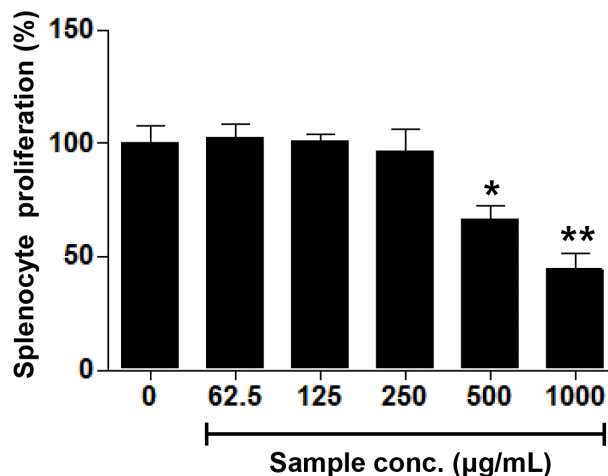
### 환형동물 추출물의 처리가 비장세포의 세포 증식능에 미치는 영향

환형동물 추출물의 처리가 비장세포의 세포 증식능에 미치는 영향에 관하여 관찰하기 위하여, C57BL/6 마우스로부터 비장조직을 적출하고, 분리된 비장조직으로부터 비장세포를 유리시켜, 환형동물 추출물을 농도별(62.5, 125, 250, 500, 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 처리하였을 때의 비장세포의 세포 증식능을 Fig. 4에 나타냈다. 환형동물 추출물을 농도별로 처리한 결과, 추출물 처리구에서 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 유의적으로 비장세포에 대한 세포독성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 지렁이 추출물의 대식세포에 대한 세포 증식능과 유사하게 고농도에서 세포독성을 나타내었다.

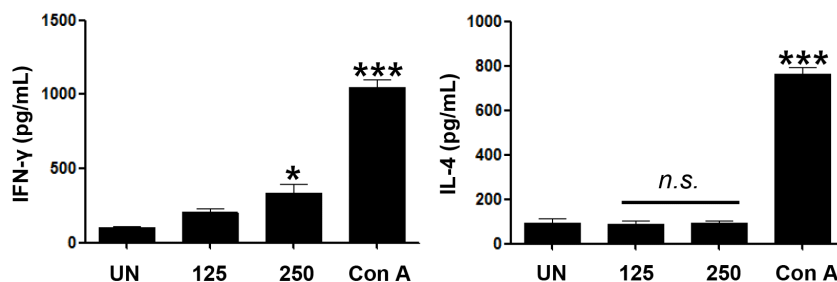
### 환형동물 추출물의 처리가 비장세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향

선천면역체계가 외래항원에 대한 보호 기작을 발동하여 활성화가 되면 탐식세포들의 활성화가 일어나고, 이러한 탐식세포들은 적응면역계에 이러한 신호를 전달하게 된다(Calixto *et al.*, 2004). 적응면역계를 담당하는 주된 생체기관은 비장으로써, 혈액에서부터 유래되는 외래항원에 대하여 주된 보호 면역을 수행하며, B 및 T 림프구의 성숙과 분화가 이루어지는 기관으로 면역시스템에서 매우 중요한 역할을 수행한다(Calixto *et al.*, 2004). 비장에 존재하는 면역세포의 분포를 보면 T세포가 70% 이상을 차지하며, 나머지는 B 및 대식세포들이 차지한다. 따라서 면역 증강물질이 면역활성을 유도하는지를 확인하는 데 있어서, 면역 T세포와의 반응을 관찰하기 위하여 비장세포 모델을 주로 사용한다(Ryu *et al.*, 2006). 면역 T 세포는 사이토카인과 일부 전사인자(transcription factor)들의 활성화에 의하여 Th1 세포와 Th2 세포로 분화하며, 각각의 세포에서 분비되는 사이토카인의 경우 면역증강이나 알레르기 유발에 밀접한 관련이 있다고 보고되어진다(Shan *et al.*, 1999). Th1 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로는 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등이 있고, Th2 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로는 IL-4, 5, 10, 13이 있으며, 특히 Th1 세포가 분비하는 사이토카인이 증가할 경우 면역활성에 밀접한 관련이 있다고 판단하며, Th2 세포가 분비하는 사이토카인이 증가할 경우 알레르기 질환이나 아토피 질환의 유발과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되어진다(Medzhitov, 2001; Wang *et al.*, 2001).

본 연구에서도 환형동물 추출물의 처리가 비장세포의 사이토카인 분비 특성에 미치는 영향에 관한 것을 알아보기 위하여, 비장조직으로부터 유리된 비장세포에 농도별(125 및 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 환형동물 추출물 처리하였을 때의 비장세포 사이토카인 분비능을 Fig. 5에 나타냈다. 게다가 양성 대조구로써 면역 T세포의 마이토젠(mitogen)인 Concanavalin(Con A)를 사용하여 환형동물 추출물과 결과를 비교하였다. 사이토카인 분비능 실험결과, 환형동물 추출물 처리구에서 Th1 세포가 분비하는 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 의 분비가 증가되었으며, Th2 세포가 분비하는 사이토카인인 IL-4의 분비량에 대한 변화는 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어 보아, 환형동물 추출물의 처리는 알레르기나 아토피 등의 질병 유발과 밀접한 관련이 있는 Th2 세포의 활성화에는 영향을 주지 않으며, 면역활성과 밀접한 관련이 있는 Th1 세포의 활성화를 유도하여 면역활성을 증강시키는 것으로 사료된다.



**Fig. 4. Splenocyte proliferation activity of water extracts from annelida (*Lumbricus rubellus*).** Extract was treated at the concentration of 62.5, 125, 250, 500, and 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in splenocytes separated from mouse. The data shown are the mean  $\pm$  SD of at least three experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  was compared with un-treated sample group.



**Fig. 5. Cytokine production (IFN- $\gamma$  and IL-4) activity of water extracts from annelida (*Lumbricus rubellus*) in splenocyte.** Extract was treated at the indicated doses (125 and 250  $\mu\text{g/mL}$ ) in splenocytes separated from mouse. The data shown are the mean  $\pm$  SD of at least three experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  was compared with un-treated sample group (UN). <sup>n.s.</sup> indicates no significant effect.

## IV. 요약

본 연구는 환형동물 추출물의 면역활성 효과에 관하여 알아보기 위하여 후보 생물(지렁이)을 선정하고, 이 추출물을 대식세포 및 비장세포에 처리하여 면역세포의 면역증강 활성에 관하여 관찰하였다. 면역활성능에 관한 평가를 진행하기 위하여 마우스의 골수에서 분리한 미분화 골수 세포를 선천면역에서 중요한 역할을 수행하는 대식세포로 분화시킨 후, 환형동물 추출물을 처리하였을 때, 대식세포의 사이토카인의 분비능이 증가되고, 활성화된 대식(면역)세포의 세포 표면에서 발현되는 세포 표면 활성인자 CD80 및 CD86의 발현이 유의적으로 증가되는 것이 관찰되었다. 또한, 후천면역에서 중요한 역할을 수행하는 면역 T세포가 다량으로 분포하는 비장 조직으로부터 비장세포를 분리하여 환형동물 추출물을 처리하였을 때, 면역활성을 조절하는 Th1세포가 분비하는 사이토카인의 함량이 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 식용으로 사용이 가능한 환형동물 추출물의 처리는 선천면역뿐만 아니라, 후천면역에 관여하는 다양한 면역세포의 활성화에 직·간접적으로 기여하며, 이들의 섭취에 따라 면역반응이 증가할 수 있는 잠재적인 가능성을 시사한다.

## References

- Balamurugan M, Parthasarathi K, Cooper EL, Ranganathan LS. 2007. Earthworm paste (*Lampito mauritii* Kinberg) alters inflammatory, oxidative, haematological and serum biochemical indices of inflamed rat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 11:77-90.
- Balamurugan M, Parthasarathi K, Ranganathan LS, Cooper EL. 2008. Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties. *J Zhejiang Univ Sci* 9B:141-147.
- Byrd JC, Park JHY, Schaffer BS, Garmroudi F, MacDonald PG. 2000. Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 25:18647-18656.
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70:93-103.
- Cannon JG. 2000. Inflammatory cytokine in nonpathological states. *News Physiol Sci* 15:298-303.
- Cha JH, Lim EM. 2014. Effects of *Gardeniae fructus* on cytokines in mouse macrophage. *J Korean Obstet Gynecol* 27:1-16.
- Chan JK, Ng CS, Hui PK. 1988. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology* 12:461-480.
- Cho YJ, Toon SJ, Kim JH, Chun SS. 2005. Biological activity of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) extract. *J Food Sci Technol* 40:545-550.
- Clerici M, Shearer GM. 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: New insights. *Immunol Today* 15:575-581.
- Hori M, Kondon K, Yoshida T, Konishi E, Minami S. 1974. Studies of antipyretic components in the Japanese earthworm. *Biochem Pharmacol* 23:1582-1590.
- Kikuchi T, Ohno N, Ohno T. 2002. Maturation of dendritic cells induced by Candida beta-D-glucan. *Int Immunopharmacol*

- 2:1503-1508.
12. Kim BH, Cho DH, Cho JY. 2007. Modulatory effect of kaempferitrin, a 3,7-diglycosylflavone, on the LPS-mediated up-regulation of surface co-stimulatory molecules and CD29-Mediated cell-cell adhesion in monocytic- and macrophage-like cells. *Yakhak. Hoeji* 51:482-489.
  13. Kim J, Ryu HS, Shin JH, Kim HS. 2005. *In vitro* and *in vivo* supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:167-175.
  14. Kim SW, Sapkota M, Li L, Yang M, Park CI, Soh Y. 2016. Anti-inflammatory and antioxidant effects of clam worm extract in macrophage RAW264.7 cells. *Kor J Pharmacogn* 47:150-157.
  15. Krizkova S, Fabrik I, Adam V, Hrabeta P, Eckschlager T, Kizek R. 2009. Metallothionein—A promising tool for cancer diagnostics. *Bratisl Med J* 110:93-97.
  16. Kwon J, Lee SJ, So JN, Oh CH. 2001. Effects of *Schizandra chinensis fructus* on the immunoregulatory action and apoptosis of L1210 cells. *Korean J Food Sci Technol* 33:384-388.
  17. Lee JY, Hwang WI, Lim ST. 1998. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines. *Korean J Food Sci Technol* 30:13-21.
  18. Lee K, Sohn Y, Lee MJ, Cho HS, Jang MH, Han NY, Shin KW, Kim SH, Cho IH, Bu Y, Jung HS. 2012. Effects of *Angelica acutiloba* on mast cell-mediated allergic reactions *in vitro* and *in vivo*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34:571-577.
  19. Liu CH, Lin YW, Tang NY, Liu HJ, Huang CY, Hsieh CL. 2013. Effect of oral administration of *Pheretima aspergillum* (earthworm) in rats with cerebral infarction induced by middle-cerebral artery occlusion. *Afr J Tradit Complem Altern Med* 10:66-82.
  20. Margoshes M, Vallee BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79:4813-4814.
  21. Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
  22. Mihara H, Maruyama M, Sumi H. 1992. Novel thrombolytic therapy discovered from traditional oriental medicine using the earthworm. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 23 suppl 2:131-140.
  23. Morgan AJ, Stürzenbaum SR, Winters C, Grime GW, Aziz Nor Azwady Abd, Kille P. 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissue. *Ecotox Environ Safe* 57:11-19.
  24. Ripoll VM, Meadows NA, Raggatt LJ, Chang MK, Pettit AR, Cassady AI, Hume DA. 2008. Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene* 413:32-41.
  25. Ryu HS, Kim J, Kim HS. 2006. Enhancing effect of *Sorghum bicolor* L. Moench (sorghum, su-su) extracts on mouse spleen and macrophage cell activation. *Korean J Food & Nutr* 19:176-182.
  26. Shan BE, Yoshida Y, Kuroda E, Yamashira U. 1999. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes *in vitro*. *Int J Immunopharmacol* 21:59-70.
  27. Suh JS. 1996. Effect of *Codonopsis lanceolata* radix water extract on immunocytes. *Korean J Food & Nutr* 9:379-384.
  28. Wang JE, Jørgensen PF, Ellingsen EA, Almiöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R. 2001. Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* 16:178-182.