

팽생이 모자반 추출물의 비장세포 면역활성 증강 효과*

김동섭¹, 성낙윤¹, 한인준¹, 이병수¹, 박상윤¹, 노은영¹, 엄 지¹, 김 건¹, 김경아^{2†}

¹한국프라임제약(주), ²충남대학교 식품영양학과

Splenocyte-mediated immune enhancing activity of *Sargassum horneri* extracts*

Dong-Sub Kim¹, Nak-Yun Sung¹, In-Jun Han¹, Byung-Soo Lee¹, Sang-Yun Park¹, Eun Young Nho¹, Ji Eom¹, Geon Kim¹ and Kyung-Ah Kim^{2†}

¹Division of Natural Product Research, Korea Prime Pharmacy CO., LTD., Jeonnam 58144, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

ABSTRACT

Purpose: This study examined the immunological activity and optimized the mixture conditions of *Sargassum horneri* (*S. horneri*) extracts *in vitro* and *in vivo* models. **Methods:** *S. horneri* was extracted using three different methods: hot water extraction (HWE), 50% ethanol extraction (EE), and supercritical fluid extraction (SFE). Splenocyte proliferation and cytokine production (Interleukin-2 and Interferon- γ) were measured using a WST-1 assay and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. The levels of nitric oxide and T cell activation production were measured using a Griess assay and flow cytometry, respectively. The natural killer (NK) cell activity was determined using an EZ-LDH kit. **Results:** Among the three different types of extracts, HWE showed the highest levels of splenocyte proliferation and cytokine production *in vitro*. In the animal model, three different types of extracts were administrated for 14 days (once/day) at 50 and 100 mg/kg body weight. HWE and SFE showed a high level of splenocyte proliferation and cytokine production in the with and without mitogen-treated groups, whereas EE administration did not induce the splenocyte activation. When RAW264.7 macrophage cells were treated with different mixtures (HWE with 5, 10, 15, 20% of SFE) to determine the optimal mixture ratio of HWE and SFE, the levels of nitric oxide and cytokine production increased strongly in the HWE with 5% and 10% of SFE containing group. In the animal model, HWE with 5% and 10% of SFE mixture administration increased the levels of splenocyte proliferation, cytokine production, and activated CD4⁺ cell population significantly, with the highest level observed in the HWE with 5% of SFE group. Moreover, the NK cell activity was increased significantly in the HWE with 5% of SFE mixture-treated group compared to the control group. **Conclusion:** The optimal mixture condition of *S. horneri* with immune-enhancing activity is the HWE with 5% of SFE mixture. These results confirmed that the extracts of *S. horneri* and its mixtures are potential candidate materials for immune enhancement.

KEY WORDS: *Sargassum horneri*, splenocyte proliferation, cytokine production, optimum mixture ratio, natural killer cell activity

서 론

면역반응은 우리 몸을 보호하기 위한 자기방어기작으로 외부로부터 유입된 다양한 감염원과 알레르겐, 체내 불필요한 대사산물들을 제거 또는 무력화하는 과정을 포함하고 항상성을 유지하여 질병의 발생을 억제시키는 역할을 수행한다 [1]. 체내 면역반응은 크게 선천성 면역반응과

후천성 면역반응 두 가지로 구분되며, 각기 면역 작용을 나타내는 담당 면역세포가 다른 특징을 가지고 있다. 선천성 면역반응을 매개하는 세포로는 자연살해세포 (natural killer cell, NK cell), 호중구, 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포와 같이 탐식작용을 담당하는 세포들이 있으며, 이 중 대식세포와 수지상세포는 면역반응의 개시자로서 외부로부터 들어오는 항원에 가장 빠르게 대응하여 포식하는 작

Received: September 23, 2019 / Revised: October 28, 2019 / Accepted: October 30, 2019

* This work was supported by grants from the Ministry of Trade, Industry & Energy (MOTIE), Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT) through the Encouragement Program for The Industries of Economic Cooperation Region (P0000611).

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-42-821-6832, email: kakim@cnu.ac.kr

© 2019 The Korean Nutrition Society

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.

용을 하며, 사이토카인을 분비해 선천면역세포의 활성을 높이거나 외부로부터 유입된 항원을 면역 T 세포에 전달하여 후천면역계의 활성 유도한다고 보고되고, NK cell은 세포독성 과립을 방출하여 암세포를 직접적으로 살해할 수 있고, interferon (IFN)- γ 와 같은 사이토카인을 분비하여 대식세포 및 T 세포를 동시에 활성화할 수 있다 [2-4]. 후천성 면역반응에 관여하는 면역세포로는 T 세포 및 B 세포가 있으며, 선천성 면역반응 후 대식세포 및 수지상세포와 같은 탐식포식세포들이 제시한 특이 항원을 T 세포가 인식하면서 T 세포 및 B 세포의 활성이 일어나고, 활성화된 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인의 작용으로 후천 면역반응이 증폭된다 [5-7].

최근 암세포를 직접적으로 사멸시킬 수 있는 다양한 화학제제 기반의 항암제가 개발되고 있으나, 심각한 독성을 유발시키는 이유로 인하여 체내 면역을 증가시켜 암세포를 억제하는 연구들이 다양하게 수행되고 있다 [8]. 다양한 연구들이 천연물에 포함되는 천연성분을 이용하여 면역증강에 관여하는 사이토카인의 함량을 증가시키거나 암세포를 직접적으로 사멸할 수 있는 면역세포의 활성을 증가시켜 항암활성을 나타내며, 이러한 천연물은 비특이적으로 다양한 면역세포들을 자극하여 생체의 항상성을 증가시키고 질병의 유발율을 감소시킨다 [9,10].

모자반목 모자반과에 속하는 갈조류인 팽생이 모자반 (*Sargassum horneri*)은 아시아-태평양 지역에서 널리 식용으로 사용되고 있는 종으로 [11-15] 최근 들어 추출물 및 이차대사물들이 가지는 여러가지 건강증진효과로 인해 우리나라에서도 점차 팽생이 모자반의 건강기능성에 대한 연구가 활발해지고 있다 [16,17]. 현재까지의 연구에 의하면 팽생이 모자반은 골다공증 방지, 항산화 및 항암효과 헤르페스 바이러스 억제효과 등을 가지는 것으로 보고되었다 [14,18-20]. 또한 최근 본 연구자들은 팽생이 모자반 열수 추출물, 주정 추출물, 그리고 초임계 추출물 중 팽생이 모자반 열수 추출물이 tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6의 생성뿐만 아니라 inducible NO synthase (iNOS) 활성화를 통한 nitric oxide (NO) 분비를 촉진하였으며 이러한 면역증진 효과는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달경로 및 nuclear factor κ B (NF- κ B) 활성화를 통해 이루어지고 있음을 확인하여 향후 대식세포의 활성 유도를 통한 면역증진 치료에 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 보여주었다 [21].

따라서 본 연구에서는 열수, 주정, 초임계 등의 서로 다른 3가지 추출방법을 사용한 팽생이 모자반 추출물을 비장세포에 처리하여 비장세포의 세포 증식능 및 사이토카인 분비능에 관하여 알아보았으며, 동일 추출물을 마우스

에 직접 투여하여 세포에서 나타나는 면역반응이 동물에서 일어나는지에 관하여 관찰하고 서로 다른 추출방법으로 추출된 추출물을 일정한 비율로 혼합하여, 최적 면역활성을 나타내는 혼합비를 결정하는 실험을 수행하여 팽생이 모자반의 면역 증강 효능을 확인하고자 하였다.

연구방법

실험재료

본 연구에 사용한 팽생이 모자반은 전라남도 완도 일대에서 수거한 후 정수를 이용하여 침지 세척 및 자숙의 탈염과정을 거친 후 건조하여 수분함량이 10% 이하로 1차 가공된 건조 원물을 상온 보관하면서 본 실험에 추출용 시료로 사용하였다.

팽생이 모자반 열수 추출물의 제조

팽생이 모자반 열수 추출물을 제조하기 위하여 수분함량이 10%이하로 1차 가공된 팽생이 모자반 원물을 100 mm 수준으로 분쇄한 다음, 시료 1 kg에 원물대비 30배에 상당한 정제수 30 L를 가하여 온도 90°C에서 4시간 동안 추출하였다. 이후 55 μ m의 백필터 (bag filter) 여과 후 원심박막농축기 (evaporator, CEP-LABO, Okawahara, Japan)를 이용하여 고형분 함량 20%brix가 되도록 농축하였고, 분무건조 (spray dryer, HKC-100-DJ, Niro, Denmark)한 것을 팽생이 모자반 열수 추출물 (HWE)로 사용하였다.

팽생이 모자반 주정 추출물의 제조

팽생이 모자반의 주정 추출물을 제조하기 위하여 50% 발효주정을 용매로 하여, 시료 1 kg에 용매 20 L를 가하여 4시간 동안 침지시켰다. 침지 후 55 μ m의 백필터 (bag filter) 여과 후 회전식 감압농축기 (Rotary evaporator, HS-20SP, Hahnshin S&T, Kim-po, Korea)를 이용, 80°C에서 농축물의 부피가 3 L가 될 때까지 감압 농축한 후, 영하 80°C 이하에 동결건조 (freeze dryer, OPR-FDT-8650, Operon, Gyeonggi, Korea)하여 팽생이 모자반 주정 추출물 (EE)로 사용하였다.

팽생이 모자반 초임계 추출물의 제조

팽생이 모자반 초임계 추출물을 제조하기 위하여, 용매는 이산화탄소로서 임계압력 73.76 bar과 임계온도 30.95°C 이상으로 액체와 기체의 확산계수와 점도, 밀도와 같은 물리화학적 특성을 모두 갖춘 초임계 이산화탄소 (supercritical carbon dioxide, Sc-CO₂)를 사용하였고 보조용매는 발효주정 (fermentation ethanol)을 사용하였다. 상기 건조된 팽생

이 모자반 원물 60 kg을 2 mm의 입자크기로 분쇄한 후, 400 bar의 압력과 50°C의 온도로 설정하고 추출 보조용매로서 발효주정을 투입하였다. 이산화탄소와 보조용매의 공급은 각각 3 L/min과 0.3 L/min의 유량으로 설정하였다. 발효주정 주입 완료 후 120분 동안 이산화탄소만을 공급하여 400 bar의 압력을 일정하게 유지하여 총 4시간 30분 동안의 초임계추출 공정을 통해 추출물을 수득하였다. 이후 회전식 감압농축기 (Rotary evaporator, HS-20SP, Hahnshin S&T, Korea)를 이용, 50°C에서 발효주정이 함유된 추출물을 완전 농축하여 최종 팽생이 모자반 초임계 추출물 (SFE)로 사용하였다.

대식세포 배양

한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 RAW264.7 마우스 대식세포를 분양 받아 100 unit/mL의 penicillin 및 streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

실험동물 및 시료투여

암컷 BALB/C 마우스 (6주령, 체중 15 ~ 18 g)를 오리엔트바이오 (Seoul, Korea)로부터 구입하여 7일간 순화시킨 후, 사육실의 온도는 23 ± 2°C, 상대습도 50 ± 5%, 명암주기는 12시간으로 일정하게 유지하였다. 본 연구에 사용된 동물실험은 경기도 경제과학진흥원 내 경기바이오센터 동물실험윤리위원회의 승인 (GBSA 2018-05-004) 후 수행하였다.

1주간의 순화를 마친 BALB/C 마우스를 7마리씩 총 7군으로 나누어, 대조군에는 PBS를 투여하였고, HWE군은 팽생이 모자반 열수 추출물을 50, 100 mg/kg body weight (BW)의 농도로 투여하였고, EE군은 팽생이 모자반 주정 추출물을 50, 100 mg/kg BW의 농도로 투여하였고, SFE군은 팽생이 모자반 초임계 추출물을 50, 100 mg/kg BW의 농도로 투여하였다. 모든 실험군의 시료투여는 1일 1회 동일 시간에 반복적으로 14일 동안 진행되었다. 마지막 투여 후 모든 그룹을 12시간 동안 절식시키고, 비장적출을 실시하였다. 적출된 비장으로부터 비장세포를 유리하여, 비장세포 증식능과 사이토카인 분비능을 분석하였다.

HWE, SFE의 최적 혼합비를 결정하기 위하여, HWE에 SFE를 5, 10, 20%의 비율로 혼합하고, 혼합된 시료를 마우스에 투여하였다. 1주간의 순화를 마친 BALB/C 마우스를 7마리씩 총 7군으로 나누어, 대조군에는 PBS를 투여하

였고, HWE에 SFE 추출물이 5% (HWE:SFE = 9.5:0.5), 10% (HWE:SFE = 9.0:1.0), 20% (HWE:SFE = 8.0:2.0) 비율로 혼합되어진 시료를 50, 100 mg/kg BW의 농도로 투여하였다. 모든 실험군의 시료투여는 1일 1회 동일 시간에 반복적으로 14일 동안 진행되었다. 마지막 투여 후 모든 그룹을 12시간 동안 절식시키고, 비장적출을 실시하였다. 적출된 비장으로부터 비장세포를 유리하여, 비장세포 증식능, 사이토카인 분비능 및 CD4⁺T의 활성화도 분석을 실시하였다.

HWE, SFE의 최적 혼합비가 NK 세포 활성능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여, 1주간의 순화를 마친 BALB/C 마우스를 7마리씩 총 2군으로 나누어 대조군에는 PBS를 투여하였고, 실험군에는 HWE:SFE = 9.5:0.5 (SFE 5%)로 혼합된 시료를 100 mg/kg BW로 2주간 경구 투여 투여하였다. 모든 실험군의 시료투여는 1일 1회 동일 시간에 반복적으로 14일 동안 진행되었다. 마지막 투여 후 모든 그룹을 12시간 동안 절식시키고, 비장적출을 실시하였다. 적출된 비장으로부터 성숙한 NK 세포를 분리하였고, NK 세포 활성능 평가에 이용하였다.

비장세포 분리

경추 탈골법으로 희생시킨 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 10%의 소태아혈청과 항생제 페니실린과 스트렙토마이신 (100 unit/mL, 100 µg/mL)을 함유한 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 배지로 3회 세척한 후 조직균질기 (tissue grinder, Corning Costar, Corning, NY, USA)로 균질화하여 비장세포를 유리시켰다. 세포현탁액에 적혈구를 제거하기 위하여 red blood cell (RBC) lysis buffer (Invitrogen Co., USA)를 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 혈구계수기를 이용하여 비장세포를 계수하였다.

비장세포 증식능 측정

96 well plate에 well당 1 × 10⁶개의 비장세포를 분주한 후 mitogen을 처리 또는 무처리한 그룹으로 나누어, mitogen 무처리군에는 PBS를 처리하였고, mitogen 처리군에는 concanavalin A (CON A) 또는 lipopolysaccharide (LPS)를 1 µg/mL의 농도로 처리하였고 24시간 후, WST-1 (Daeil Lap Science, Seoul, Korea) 용액을 각각의 well에 10 µL씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 증식능을 평가하였다. 세포 증식능의 평가는 시료 대신 phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen Co., USA)를 투여한 대조군 대비 %로 증감을 나타내었다.

대식세포 세포생존율 평가

HWE, SFE의 최적 혼합비를 결정하기 위하여, HWE에 SFE를 5, 10, 15 및 20%의 비율로 혼합하고, RAW264.7 대식세포에 처리하여 다양한 배합비에 따른 세포 생존율에 관하여 관찰하였다. 96 well plate에 RAW264.7 세포를 2×10^4 cell/well로 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, PBS에 희석된 HWE + SFE (5, 10, 15 및 20%) 추출물을 각각 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/mL의 농도로 처리하였고, 양성 대조구인 LPS (Sigma-Aldrich) 또한 1 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, well당 20 µL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT; Sigma-Aldrich) MTT 용액 (1 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 시약의 첨가로 생긴 formazan을 녹이기 위해서 DMSO (Sigma-Aldrich)를 100 µL씩 첨가하고, 1시간 후 micro-plate reader (Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, control (PBS only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

대식세포 NO 및 사이토카인 분비능 평가

48 well plate에 RAW264.7 대식세포를 5×10^4 cell/well로 분주한 후 HWE와 SFE 혼합물을 처리하였고, 24시간 배양 후 분리된 배양 상등액 100 µL에 동량의 Griess (Sigma-Aldrich) 시약을 처리하여 10분 동안 암실에서 반응시킨 후, micro-plate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO₂, Sigma-Aldrich)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다. 또한 배양 상등액 내 사이토카인 (TNF- α 및 IL-6)의 함량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 사이토카인의 농도는 kit에 포함되어 있는 표준용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

활성화된 CD4⁺ T 세포 분석

CD4⁺ T 세포의 활성도를 측정하기 위하여 분리된 비장 세포에 PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD4, PE-Cy7-conjugated anti-CD25 (BD Bioscience)를 tube 당 1 µg의 농도로 처리하였고, 4°C에서 30분간 반응시켰다. 1 mL의 PBS를 넣어 3회 세척한 후, flow cytometry (Cytomics FC500, Beckman, Miami, FL, USA)로 CD4⁺ T 세포의 활성도를 측정하였다.

Natural killer (NK) 세포 활성 측정

분리된 비장세포 내 NK 세포를 분리하기 위하여 Magnetic activated cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany)을 이용하여 MS column을 통과하는 세포를 negative selection 하였으며, 분리된 NK 세포를 유세포 분석기 (Novios, Beckman Coulter, Miami, FL)를 이용하여 CD3⁻ NK1.1⁺ 세포의 분포가 80%이상임을 확인하였다. 분리된 NK 세포를 이용하여 세포용해 활성도 분석용 YAC-1의 세포와 함께 effector cell:target cell (E:T)의 비율을 20:1, 10:1, 5:1, 1:1로 96 well plate에 18시간 동안 함께 반응 시킨 후 EZ-LDH kit (Daeil Lap Science, Korea)를 이용하여 세포의 용해능을 450 nm 파장에서 측정하였으며, 실험에 사용한 target cell의 세포수는 4.5×10^4 으로 고정하여 실험을 진행하였다.

통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical package for social sciences (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 평균 (mean) \pm 표준편차 (SD)로 나타났다. 각 실험구의 분석 항목별 통계적 유의성은 Student's two tailed t-test 로 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 수준에서 비교하였다.

결 과

추출방법별 팽생이 모자반 추출물이 비장세포 증식 및 사이토카인 분비능에 미치는 영향

체내에서 비장 (spleen)은 혈액에서 유래되는 항원에 대한 주된 보호 면역 반응을 담당하는 장기로 B 및 T 림프구의 성숙과 항원의 자극에 의한 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프 기관이다. 따라서 비장세포의 증식은 면역 시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다 [22]. 특히 비장세포는 면역 반응과 밀접한 관련을 나타내며, 그 크기나 수가 직접적인 지표로 이용될 수 있어 대표적인 면역지표로 사용된다 [23]. 따라서, 팽생이 모자반 추출방법별 추출물의 비장세포 증식 및 사이토카인 분비능에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 BALB/C 마우스로부터 비장을 적출하고 유리된 비장세포에 팽생이 모자반 열수 추출물 (HWE), 주정 추출물 (EE), 초임계 추출물 (SFE)를 처리하여 비장세포 증식 및 사이토카인 분비능을 측정하였다. 추출방법별 팽생이 모자반 추출물을 농도 (3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/mL)별로 처리한 결과, 모든 추출물 처리구에서 세포 독성이 관찰되지 않았으며, HWE 및 EE 처리구에서 비장세포의 증식능이 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하는 것으

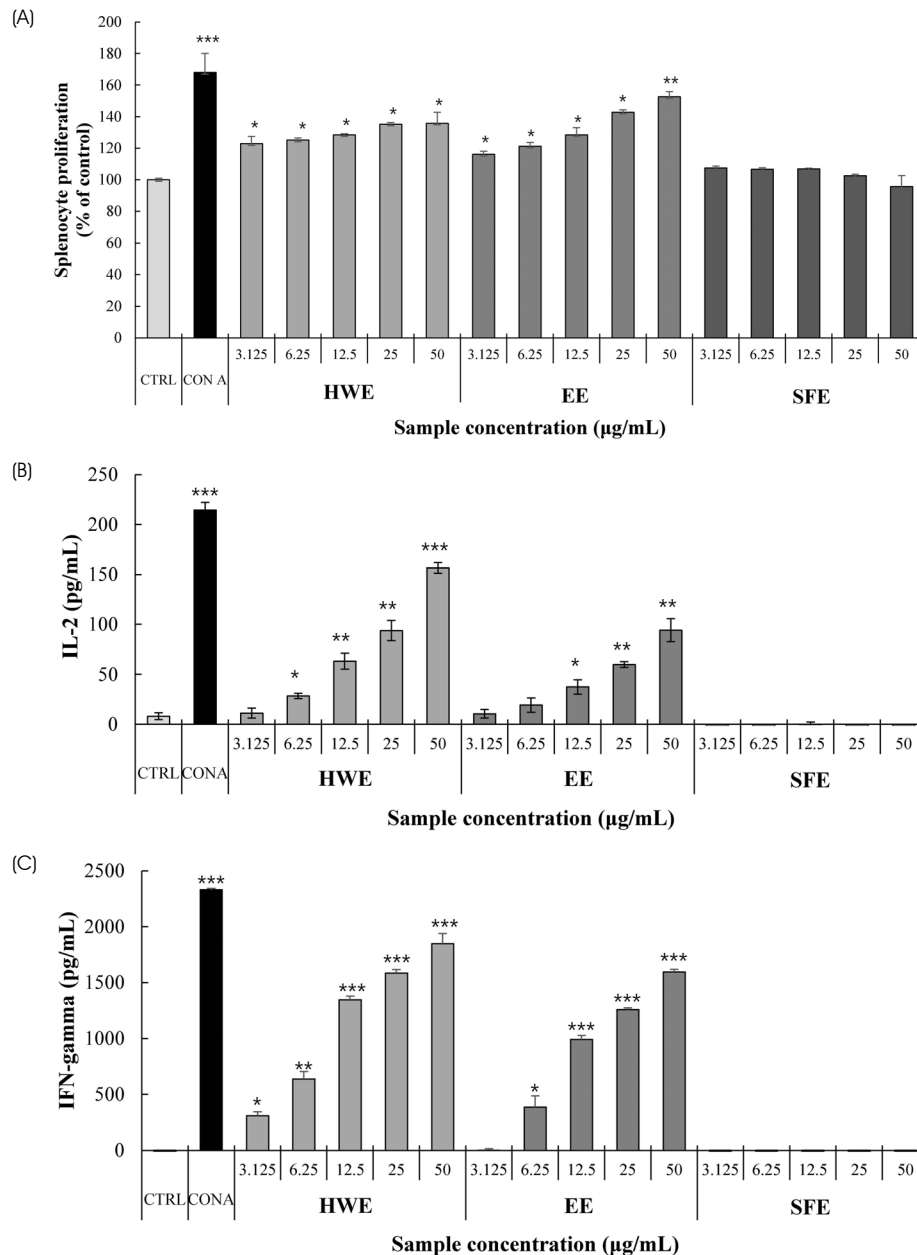


Fig. 1. Effects of different types of *Sargassum horneri* extracts on the splenocyte proliferation and cytokine production in *in vitro*. Isolated splenocytes were treated with HWE, EE, and SFE at the concentration of 3.125, 6.25, 12.5, 25, or 50 $\mu\text{g/mL}$. CON A (1 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control. After 24 h, cell proliferation and cytokine production were determined by WST-1 assay and ELISA kit. Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control (CTRL) group. HWE, hot water extract; EE, ethanol extract; SFE, supercritical fluid extract.

로 나타났다 (Fig. 1A). 또한 사이토카인 (IL-2 및 IFN- γ) 분비능에 관하여 관찰한 결과, 비장세포 증식능의 결과와 유사하게 HWE 및 EE 처리구에서 IL-2 및 IFN- γ 의 분비능이 처리 농도의존적으로 유의적으로 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 1B, 1C). 반면, SFE 처리구의 비장세포 증식능 및 사이토카인 분비 유도

능이 관찰되지 않았다.

추출방법별 팽생이 모자반 추출물 섭취 마우스의 비장 세포 증식능 및 사이토카인 분비능

추출방법별 팽생이 모자반 추출물의 투여가 마우스의 면역활성에 미치는 영향에 관하여 관찰하기 위하여, 추출

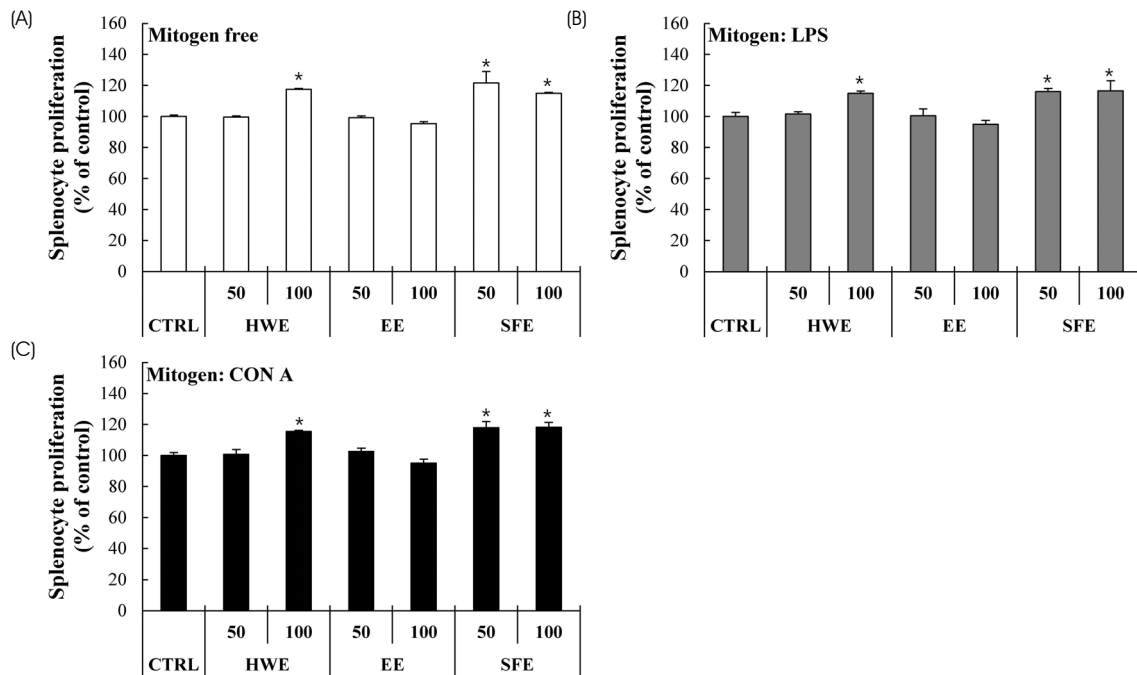


Fig. 2. Effect of orally administrated different types of *Sargassum horneri* extracts on the splenocyte proliferation. HWE, EE, and SFE were orally treated for 14 days (once/day) at the concentration of 50 or 100 mg/kg body weight. Isolated splenocytes were stimulated with mitogen (LPS; 1 μ g/mL, CON A; 1 μ g/mL) for 24 h. Cell proliferation was determined by WST-1 assay. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of * *p* < 0.05 compared to control (CTRL) group. HWE, hot water extract; EE, ethanol extract; SFE, supercritical fluid extract.

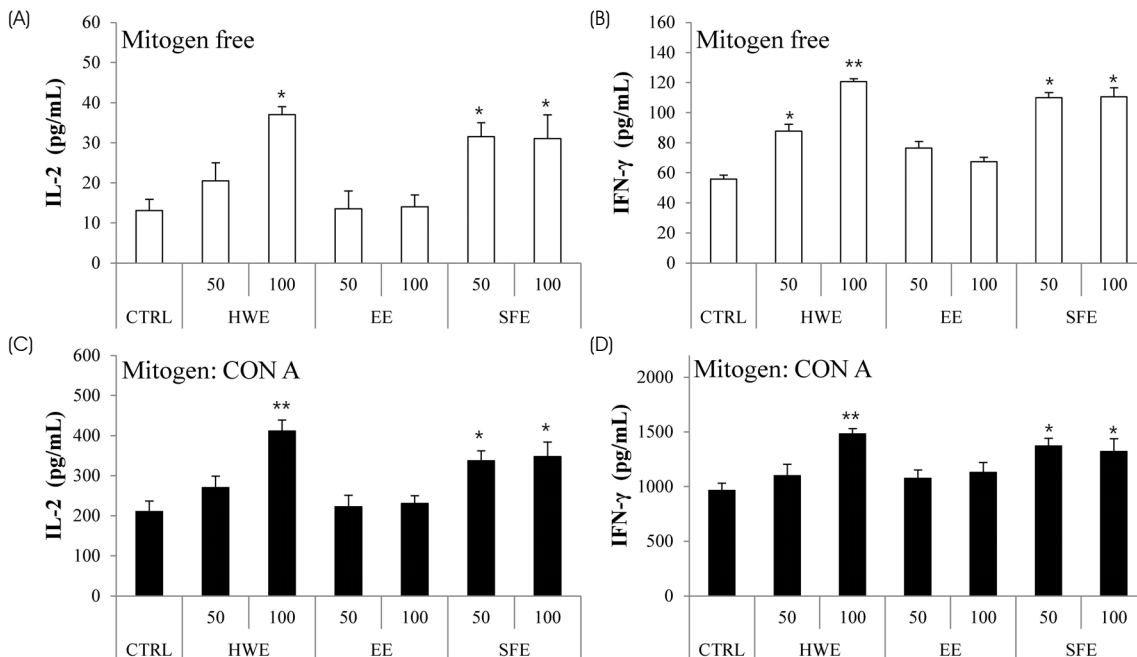


Fig. 3. Effect of orally administrated different types of *Sargassum horneri* extracts on cytokine (IL-2 and IFN- γ) productions in splenocytes. HWE, EE, and SFE were orally treated for 14 days (once/day) at the concentration of 50 or 100 mg/kg body weight. Isolated splenocytes were stimulated with mitogen (CON A; 1 μ g/mL) for 24 h. Cytokine production was determined by ELISA kit. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of * *p* < 0.05, and ** *p* < 0.01, compared to control (CTRL) group. HWE, hot water extract; EE, ethanol extract; SFE, supercritical fluid extract.

방법 (HWE, EE, SFE)별 추출물을 50, 100 mg/kg BW로 1일 1회 14일간 투여하고, 투여된 마우스의 비장을 적출하여 비장에서 유래된 비장세포의 증식능 및 사이토카인 분비능에 관하여 관찰하였다.

Mitogen은 특정 면역세포를 자극하여 면역세포를 활성을 촉진 시켜주는 물질을 총칭하고, 이러한 mitogen은 세포의 종류에 따라 다양하게 존재한다 [24]. 비장세포 실험에서 대표적으로 사용하는 mitogen으로써 CON A와 LPS를 들 수 있는데, CON A는 T 세포를 자극하여 세포증식을 유도하고 사이토카인의 분비를 증가시키며, LPS는 B 세포를 자극하여 세포활성을 유도시킨다 [25]. 따라서 이러한 mitogen의 병용처리는 시료처리에 대한 세포의 민감성을 증가시켜 세포활성 여부의 판단을 용이하게 해 줄 수 있다. 팽생이 모자반 투여 마우스로부터 분리된 비장세포의 증식능에 관하여 알아본 결과, mitogen 무처리구, mitogen CON A 처리구, mitogen LPS 처리구에서 HWE 및 SFE 처리구에서 비장세포 증식능이 유의적으로 증가되는 것으로 나타났으며, EE 처리구에서는 비장세포 증식능의 유의적인 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 또한 비장세포 배양 상등액에서 사이토카인의 분비능에 관하여 관찰한 결과, 비장세포의 증식능 결과와 유사하게 mitogen 무처리구와 mitogen CON A 처리구에서 HWE 및 SFE 처리구에서 IL-2와 IFN- γ 의 분비가 유의적으로 증가되는 것으로 나타났으며, EE 처리구에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 3). 이상의 결과로 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 팽생이 모자반 추출물인 HWE 및 SFE가 면역증강 효과에 있는 것으로 확인되어, 추후 이 2가지 추출물의 최적혼합비에 대하여 결정에 관한 실험을 대식세포 모델 및 동물모델에서 확인하는 실험을 진행하였다.

팽생이 모자반 추출물의 최적 배합비 결정을 위한 대식세포 세포독성 및 NO 분비능과 사이토카인 분비능 평가

상기 결과에서 효과가 검증된 HWE와 SFE를 대상으로 최적 혼합비율을 결정하기 위하여 HWE와 SFE의 혼합추출물을 제조하였고, 이 추출물의 대식세포 활성 및 NO 분비능에 관하여 관찰하였다.

먼저 RAW264.7 대식세포에서 각각 혼합 비율별 세포독성을 농도 (6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$)별 평가한 결과, 모든 처리구에서 세포독성은 나타나지 않았으며, HWE에 SFE를 5, 10, 15% 혼합한 추출물 처리구에서 세포 증식능이 처리농도 의존적으로 증가되는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4A). 반면 HWE에 SFE를 20% 혼합한 추출물 처리구에서는 증식능의 유의적인 증가가 관찰되지 않았다. 혼합추출물에 대한 대식세포의 NO 분비능에 관하여 관찰한 결과,

모든 혼합추출물 처리구에서 처리 농도 의존적으로 NO 분비능이 증가하는 것으로 관찰되었으며, HWE에 SFE를 20% 혼합한 추출물 처리구에서는 그 증가폭이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 4B).

HWE와 SFE추출물을 혼합비율별 6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 TNF- α 및 IL-6의 분비량에 관하여 관찰한 결과, 모든 처리구에서 TNF- α 의 분비량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 HWE에 SFE를 5, 10% 혼합한 추출물 처리구에서 증가폭이 가장 높게 나타나는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4C). IL-6 결과 또한 TNF- α 의 분비량과 유사하게 HWE에 SFE를 5, 10% 혼합한 추출물 처리구에서 가장 높은 분비량이 관찰되었다 (Fig. 4D). 따라서 본 연구 결과를 통하여 HWE에 SFE를 5%와 10% 혼합한 추출물 처리구가 대식세포 활성화 효과가 가장 높은 것으로 관찰되어 최적 혼합비율로 판단되었으며, 이를 증명하기 위하여 동물실험을 진행하였다.

팽생이 모자반 추출물의 최적 배합비의 투여가 면역활성에 미치는 영향

HWE에 SFE를 5, 10, 20%로 혼합한 추출혼합물을 100 mg/kg BW로 1일 1회 14일간 투여하고, 투여된 마우스의 비장을 적출하여 비장에서 유래된 비장세포의 증식능 및 사이토카인 분비능에 관하여 관찰하였다.

HWE에 SFE를 5, 10, 20%로 혼합한 추출혼합물을 투여한 마우스의 비장에서 분리된 비장세포의 증식능에 관하여 평가한 결과, mitogen 무처리구, mitogen CON A 처리구, mitogen LPS 처리구에서 HWE에 SFE를 5% 및 10%로 혼합한 추출혼합물 투여 시 유의적으로 가장 높은 비장세포 증식능이 관찰되었으며, HWE에 SFE가 20%로 혼합된 추출혼합물 투여구에서는 5%, 10% 첨가구와 비교하였을 때 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5). 비장세포 배양 상등액에서 사이토카인 (IL-2, IFN- γ)의 분비량에 관하여 관찰한 결과, mitogen 무처리구에서 HWE 투여군, HWE에 SFE를 5% 및 10%로 혼합한 추출혼합물 투여 시 유의적으로 높은 IL-2와 IFN- γ 의 분비량이 관찰되었다 (Fig. 6). Mitogen CON A 처리구에서는 mitogen 처리에 의해 IL-2와 IFN- γ 의 분비량이 전반적으로 높아지는 것으로 관찰되었고, 투여군간의 비교에서 대조군 (CTRL)에 비해 HWE 투여군, HWE에 SFE를 5% 및 10% 혼합한 투여구에서 IL-2와 IFN- γ 의 분비량이 증가되는 것으로 관찰되었으며 HWE에 SFE를 5%로 혼합한 추출혼합물 투여구에서 가장 높게 증가 되는 것으로 관찰되었다.

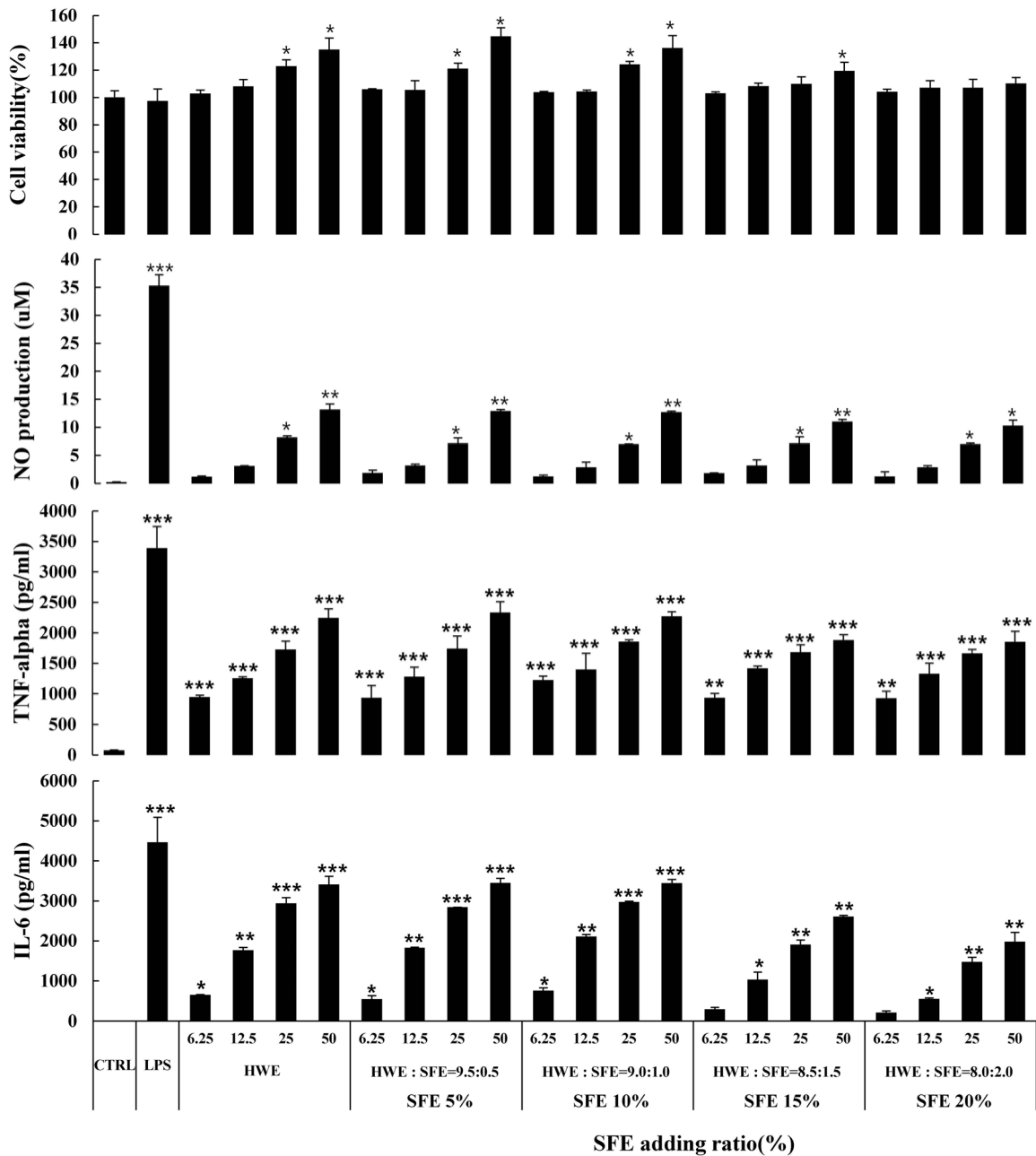


Fig. 4. Determination of optimum mixing ratio of HWE and SFE extracts from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophage cells. HWE was mixed with 5 %, 10%, 15%, 20% of SFE and treated at the concentration of 6.25, 12.5, 25, and 50 μ g/mL in RAW264.7 macrophage cell. After 24 h, cell proliferation and cytokine productions were determined by MIT assay and ELISA kit, respectively. NO production was detected by using Griess reagent. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of * *p* < 0.05, and ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001 compared to control (CTRL) group. HWE, hot water extract; SFE, supercritical fluid extract.

팽생이 모자반 추출물의 최적 배합비의 투여가 면역 T 세포의 활성화에 미치는 영향

다양한 면역세포구들은 세포 표면에 가지고 있는 표면 분자구조에 따라 서로를 구분하며, 이러한 구분은 분화집단 (CD)이라는 표현형을 사용한다 [26]. CD는 활성화된 T

세포의 분열을 촉진시키는 항원제시 세포로서의 역할이 필수적으로 요구되는 세포막 단백질로 세포의 활성화와 관련하여 중요한 지표로 이용된다 [27]. 일반적으로 T 세포의 분화집단은 CD3로 표현되며, 주로 사이토카인을 생산하는 역할을 하는 CD4와 세포독성 T 세포인 CD8으로

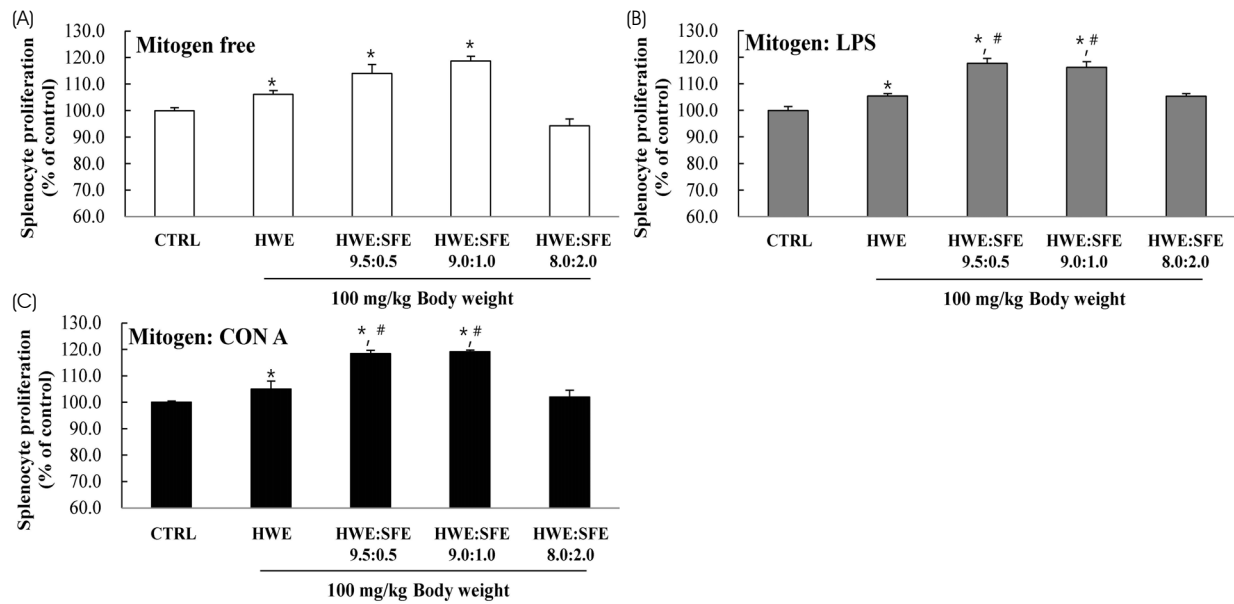


Fig. 5. Effect of optimum mixing ratio of HWE and SFE extracts from *Sargassum horneri* on the splenocyte proliferation. HWE was mixed with 5 %, 10%, or 20% of SFE and orally treated for 14 days (once/day) at the concentration of 100 mg/kg body weight. Isolated splenocytes were stimulated with mitogen (LPS; 1 µg/mL, CON A; 1 µg/mL) for 24 h. Cell proliferation was determined by WST-1 assay. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of **p* < 0.05 compared to control (CTRL) group and of [#]*p* < 0.05, compared to HWE treated group. HWE, hot water extract; SFE, supercritical fluid extract.

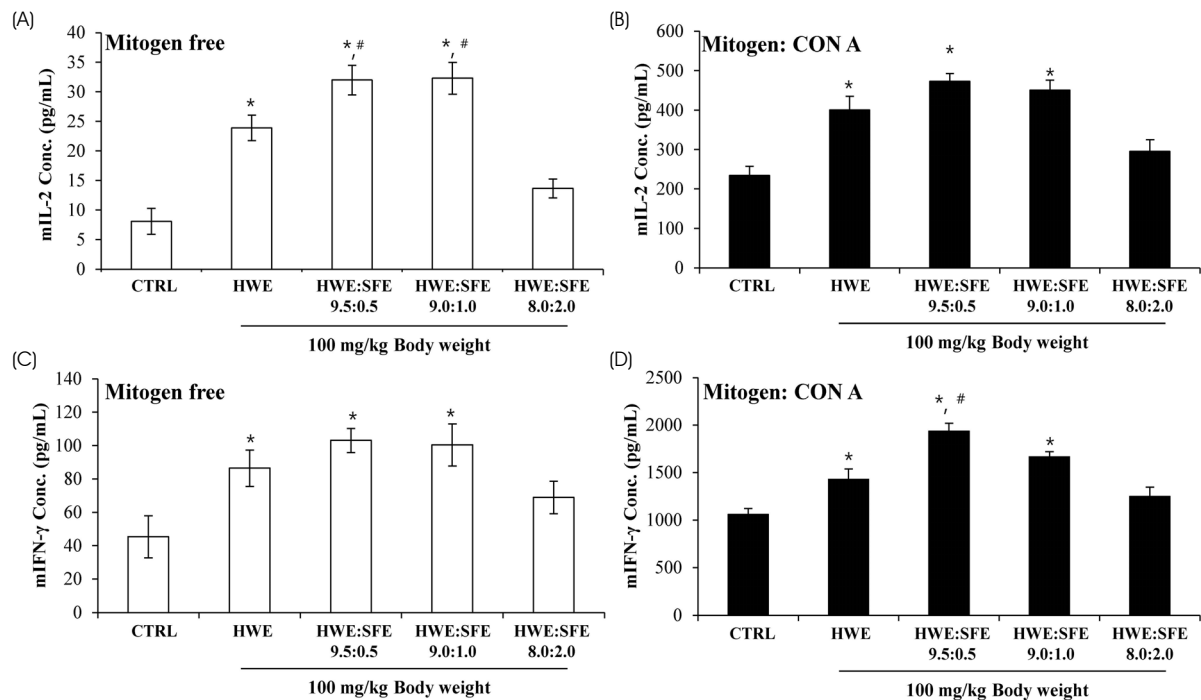


Fig. 6. Effect of optimum mixing ratio of HWE and SFE extracts from *Sargassum horneri* on the splenocyte cytokine (IL-2 and IFN-γ) productions. HWE was mixed with 5 %, 10%, or 20% of SFE and orally treated for 14 days (once/day) at the concentration of 100 mg/kg body weight. Isolated splenocytes were stimulated with mitogen (CON A; 1 µg/mL) for 24 h. Cytokine production was determined by ELISA kit. Results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of **p* < 0.05 compared to control (CTRL) group and of [#]*p* < 0.05, compared to HWE treated group. HWE, hot water extract; SFE, supercritical fluid extract.

분류된다 [28]. T 세포 각각의 분화집단들의 활성화 여부는, 분화와 관련된 사이토카인인 IL-2의 receptor alpha chain (CD25)의 발현으로 확인할 수 있다 [29].

상기 팽생이 모자반 추출물의 최적 배합비 투여 결과에서 비장세포의 사이토카인 분비를 증가시키는 것으로 관찰되어, 추출물의 투여가 사이토카인을 생성하는 CD4 T 세포의 활성화에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다.

HWE에 SFE를 5%, 10% 및 20%로 혼합한 추출혼합물

을 투여한 마우스의 비장에서 분리된 비장세포의 CD4 T 세포의 활성화에 관하여 평가한 결과, 대조구와 비교하여 HWE 처리구 및 HWE/SFE 혼합 처리구에서 CD4+/CD25+의 발현이 높게 나타나는 것으로 관찰되었고, HWE와 HWE에 SFE를 5%, 10% 및 20% 혼합하여 제조한 추출물 처리구를 비교하였을 때, HWE 단독구에 비해 HWE에 SFE를 5% 혼합하여 제조한 추출물 처리구에서 유의적으로 발현이 증가되는 것으로 관찰되었다 (Fig. 7). 따라서

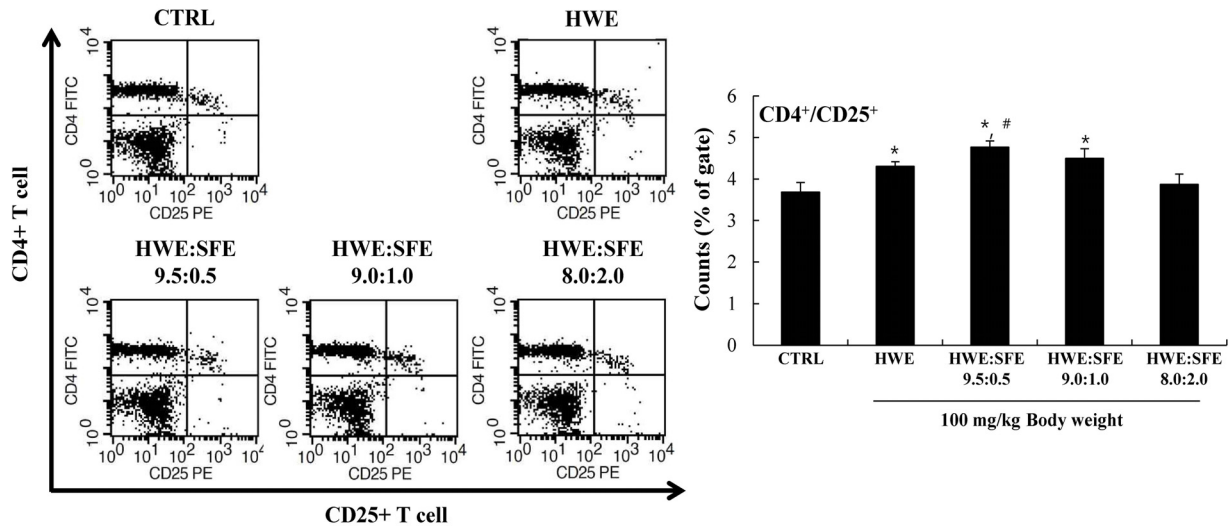


Fig. 7. Effect of optimum mixing ratio of HWE and SFE extracts from *Sargassum horneri* on CD4⁺ T cell activation. HWE was mixed with 5 %, 10%, or 20% of SFE and orally treated for 14 days (once/day) at the concentration of 100 mg/kg body weight. Isolated splenocytes were treated with PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD4, PE-Cy7-conjugated anti-CD25 antibody for 0.5 h at 4°C. T cell population was calculated by flow cytometer. Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of * *p* < 0.05, compared to control (CTRL) group and of # *p* < 0.05, compared to HWE treated group. HWE, hot water extract; SFE, supercritical fluid extract.

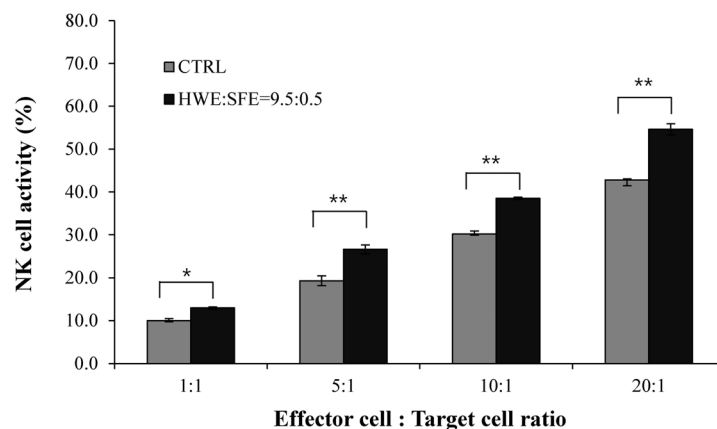


Fig. 8. Effect of optimum mixing ratio between HWE and SFE extracts from *Sargassum horneri* on NK cell activity. HWE was mixed with 5 %, 10%, or 20% of SFE and orally treated for 14 days (once/day) at the concentration of 100 mg/kg body weight. NK cells were isolated from spleen and purified by Magnetic activated cell sorting system. NK cells (effector cell) were mixed with YAC-1 cell (target cell) as a ratio of 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 (effector cell : target) and NK cell activity was determined by LDH assay. Results are expressed as the mean \pm SD (*n* = 3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of * *p* < 0.05, and ** *p* < 0.01, compared to control (CTRL) group. HWE, hot water extract; SFE, supercritical fluid extract.

HWE 처리구 및 HWE/SFE 혼합처리구의 투여는 비장세포의 CD4 T 세포를 활성화시켜 사이토카인의 분비를 유도시키는 것으로 사료되며, 사이토카인 분비 유도에 관여하는 팽생이 모자반 추출물의 최적 배합비는 HWE에 SFE를 5%를 첨가한 것으로 사료된다.

팽생이 모자반 추출물의 최적 배합비의 투여가 NK 세포 활성화에 미치는 영향

비장세포 증식능, 사이토카인 분비능 및 CD4 T 세포 활성능을 통하여 결정된 팽생이 모자반 추출물의 최적비(HWE에 SFE를 5%를 첨가한 것, HWE:SFE = 9.5:0.5)의 NK 세포 활성능을 평가하기 위하여, HWE에 SFE를 5%로 혼합한 추출혼합물을 100 mg/kg BW로 1일 1회 14일간 투여하고, 투여된 마우스의 비장을 적출하여 비장세포 내 성숙한 NK 세포를 분리하였고, 분리된 NK 세포 (Effector cell)에 암세포 (Target cell; Yac-1)를 혼합하여 NK 세포 활성을 평가하였다.

비장에서 분리된 NK 세포에 암세포를 비율 (1:1, 5:1, 10:1, 20:1)별로 처리하여 암세포를 사멸하는 NK 세포의 활성능을 측정한 결과, effector cell의 농도 의존적으로 NK 세포 활성능이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 8). 가장 높은 NK 세포 활성능은 Effector cell:Target의 비율이 20:1에서 나타났으며, 대조구와 팽생이 모자반 최적 배합비 투여군 간의 효능을 비교하였을 때 모든 비율 처리구 (1:1, 5:1, 10:1, 20:1)에서 팽생이 모자반 추출물의 NK 세포 활성능이 유의적으로 높게 나타나는 것으로 관찰되었다.

고 찰

대식세포 및 수지상세포는 선천면역에 관여하는 대표적인 탐식세포로서, 외부로부터 생체로 유입된 바이러스 및 세균과 같은 병원체를 직접적으로 탐식하거나, 사이토카인과 같은 면역 매개물질을 분비함으로써 면역반응을 유도한다 [30]. 특히, 활성화된 대식세포가 분비하는 NO는 면역신호 전달자로서 면역세포를 활성화시켜 암세포에 대한 독성 및 외부 병원체로부터의 저항성을 증강시킨다고 알려져 있다 [31]. 활성화된 대식세포에서 분비되는 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등의 사이토카인은 대식세포뿐만 아니라 다른 면역세포 또한 활성화시키기 때문에 면역반응에서 매우 중요한 인자 중 하나이다 [4]. TNF- α 는 종양괴사인자로서 병원체에 의해 오염된 세포에 대한 세포독성을 일으켜 숙주 방어작용을 유도하며, 감염범위를 극소화시켜 초기 면역반응의 중요한 역할 매개한다 [7]. IL-6는 B 세포와 T 세포를 자극시켜 체액성 면역반응을 조절하고 조절

작용을 증가시키며, IL-1 β 는 TNF- α 와 유사하게 병원성 항원의 확산을 감소시키며, B 세포와 T 세포의 세포활성에 관여하여 후천성 면역반응을 촉진시킨다 [2]. 최근 본 연구자들은 RAW264.7 대식세포에서 팽생이 모자반 열수추출물을 처리할 경우 TNF- α 와 IL-1 β 의 분비뿐만 아니라 iNOS 발현을 통한 NO 분비능이 증가함을 관찰하여 모자반 추출물이 대식세포의 사이토카인 분비능 조절뿐만 아니라 NO 분비 증가를 통한 면역세포 활성화를 통해 면역증진 활성을 가짐을 보고하였다 [32].

비장은 항원에 대한 주된 보호 면역 반응을 담당하는 장기로 B 및 T 림프구의 성숙, 항원의 자극에 의한 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프 기관이며 비장세포의 증식은 면역시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다 [22]. 또한, 비장에서 유리된 비장세포에는 면역 T 세포, B 세포, 대식세포 등의 다양한 면역 세포들이 존재하고 있으며, 배양 상등액에는 이들 면역 세포들이 분비하는 사이토카인을 다량으로 포함하고 있다. T 세포의 성장 및 분화에 중요한 영향을 미치는 사이토카인인 IL-2는 대부분 CD4⁺ T 세포에서 분비되며, T 세포의 증식에 관여하고 면역반응을 매개하고 면역반응의 강도를 결정하는데 주요 인자이며, IFN- γ 와 TNF- α 를 포함하여 T 세포에서 분비되는 다른 사이토카인의 생성을 촉진시킨다 [33]. IL-2는 항원 특이 killer T 세포 유도시키고 NK 세포활성, lymphokine activated killer (LAK) 세포활성, B 림프구 증식 및 분화 촉진 등에 관여하며 조절조절 작용에서 NK 세포의 INF- γ 생산을 촉진시켜 적혈구 colony 형성을 억제한다고 보고되어있다 [34]. IFN- γ 는 대부분의 세포를 표적기관으로 하여 분비되며, 대식세포에 대해 강력한 활성화 기능을 가지며 항원제시세포에서 MHC class I과 II의 발현을 유도하고 T 세포의 분화를 촉진시켜 호중구와 혈관내피세포의 활성화를 시킨다 [35-37].

NK 세포는 선천면역을 담당하는 주요세포로서, 감염된 세포나 종양세포 등의 표적세포를 인지하여 결함을 유도하고, 독성과립들을 표적세포에 전달하여 세포사멸을 유도한다 [38]. 이러한 NK 세포는 IFN 나 대식세포에서 유래된 사이토카인에 의하여 활성화되며, 활성화된 NK 세포는 IFN- γ , TNF- α 등의 사이토카인을 분비하여 종양세포의 세포사멸을 촉진시키거나 다른 면역세포의 활성화에 기여한다 [39]. NK 세포의 활성화는 다양한 활성화 및 억제 수용체가 존재하여 신호전달 균형에 의해 활성이 조절되며, 이러한 조절에 의하여 정상세포는 공격하지 않고 감염된 세포를 제거하게 된다. 이러한 특성에 따라 항암연구에서 자연살해세포 활성화와 연관된 연구가 활발히 진행 중이다 [40,41]. 본 연구에서 유리된 비장세포에 팽생이 모자

반 추출물을 처리하였을 때뿐만 아니라 팽생이 모자반 투여 마우스로부터 분리된 비장세포의 증식능과 IL-2와 IFN- γ 등 사이토카인 분비능 또한 증가하는 것으로 나타났으며 이는 팽생이 모자반 추출물이 대식세포 증식능 및 NO 유도 분비능과 사이토카인 분비능의 증가뿐만 아니라 비장세포 증식능 및 사이토카인 분비 유도를 통해 면역증강의 활성을 가짐을 의미한다. 또한 mitogen인 concanavalin A 투여군과 미투여군에서 모두 EE를 제외한 팽생이 모자반 추출물이 비장세포를 증식시키는 mitogen 활성이 있음을 보여주는 것으로, 이러한 결과는 외부의 항원에 노출되었을 때 팽생이 모자반 추출물이 면역반응을 유도하는 비장세포와 대식세포, 그리고 NK 세포 등 면역세포의 수와 활성을 증가시킴으로써 항원에 대한 효과적인 방어에 도움을 줄 것으로 사료된다. 이 때 서로 다른 팽생이 모자반 추출물 중 HWE에 SFE를 5% 혼합한 추출물 섭취군에서 비장세포 증식능 및 사이토카인의 분비능과 T 세포 활성이 높게 나타났으며 NK 세포 활성능도 높게 나타났다. 결론적으로 면역활성에 관여하는 팽생이 모자반 추출물의 최적배합비는 HWE에 SFE를 5%를 첨가한 것으로 확인하였으며, 이러한 결과는 팽생이 모자반 추출물을 이용하여 건강기능성제품을 개발함에 있어, 기초적인 자료로서 다양하게 활용될 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 팽생이 모자반 추출물의 추출방법에 따른 면역증강활성에 관하여 비교 관찰하였고, 추출물간의 혼합비율을 다르게 혼합하여 제조한 팽생이 모자반 추출물의 최적 면역활성을 갖는 혼합비를 평가하였다. 비장세포에 팽생이 모자반 열수 (HWE), 주정 (EE), 초임계 (SFE) 추출물을 각각 처리하였을 때 HWE 및 SFE 처리구에서 비장세포 증식능 및 사이토카인 (IL-2, IFN- γ) 분비능이 높게 나타나는 것으로 관찰되었고, 각각의 추출물을 50, 100 mg/kg BW의 농도로 2주간 마우스에 투여하고 비장을 적출하여 비장세포 활성능에 관하여 관찰한 결과, HWE 및 SFE 투여구에서 비장세포 증식능 및 사이토카인 분비능이 높게 나타나는 것으로 관찰되었다. 동물실험에서 높은 활성을 보인 HWE와 SFE의 추출물의 혼합 최적비를 평가하기 위하여 HWE에 SFE를 5, 10, 15 및 20%로 혼합하여 대식세포에 처리하여 NO 및 사이토카인 분비능에 관하여 관찰한 결과, SFE를 5%, 10% 혼합한 추출물 처리구에서 활성이 높게 나타나는 것으로 관찰되었으며 혼합추출물을 100 mg/kg BW으로 14일간 투여한 마우스의 비장세포 활성에 관하여 관찰한 결과, SFE를 5%의 비율로 혼합한 추

출물 처리구 비장세포 활성이 높게 나타나는 것으로 관찰되어 HWE와 SFE의 최적 혼합 비율을 HWE에 SFE를 5% 첨가하는 것으로 결정하였다. 결정된 최적혼합비로 100 mg/kg BW의 농도로 14일간 투여한 마우스의 비장세포에서 NK 세포를 분리하여 NK 세포의 활성능을 평가한 결과, 대조구 대비 높게 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 팽생이 모자반 추출물을 최적비율로 혼합하여 제조한 혼합추출물은 비장세포, 대식세포 및 NK 세포에 대한 높은 활성능을 나타내어 면역증진에 기여하는 것으로 판단된다.

ORCID

김동섭: <https://orcid.org/0000-0002-6843-0360>

성낙윤: <https://orcid.org/0000-0002-7506-8697>

한인준: <https://orcid.org/0000-0001-8706-8363>

이병수: <https://orcid.org/0000-0002-6098-4449>

박상윤: <https://orcid.org/0000-0002-0668-1826>

노은영: <https://orcid.org/0000-0003-3241-0963>

엄 지: <https://orcid.org/0000-0001-8172-9546>

김 건: <https://orcid.org/0000-0002-5092-9665>

김경아: <https://orcid.org/0000-0002-2611-3033>

References

1. Tomasi TB Jr, Tan EM, Solomon A, Prendergast RA. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J Exp Med* 1965; 121(1): 101-124.
2. Byun EH. Immunomodulatory activities of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Korean J Food Sci Technol* 2017; 49(5): 559-566.
3. Cho EJ, Lee JH, Sung NY, Byun EH. Anti-inflammatory effects of *Annona muricata* leaf ethanol extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2017; 46(6): 681-687.
4. Kim YE, Lee JH, Sung NY, Ahn DH, Byun EH. A comparative study of the immuno-modulatory activities of ethanol extracts and crude polysaccharide fractions from *Annona muricata* L. *Korean J Food Sci Technol* 2017; 49(4): 453-458.
5. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 44(2): 143-161.
6. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 2006; 6(3): 317-333.
7. Sung NY, Park WY, Kim YE, Cho EJ, Song H, Jun HK, et al. Increase in antioxidant components and reduction of off-flavors on radish leaf extracts by extrusion process. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2016; 45(12): 1769-1775.
8. Kim JS, Oh CH, Jeon H, Lee KS, Ma SY. Immuno-regulatory property of fruit-extracts of *Cornus kousa* Burg. *Korean J Med Crop Sci* 2002; 10(5): 327-332.

9. Lee JY, Hwang WI, Lim ST. Effect of Platycodon grandiflorum DC extract on the growth of cancer cell lines. *Korean J Food Sci Technol* 1998; 30(1): 13-21.
10. Byrd JC, Park JH, Schaffer BS, Garmroudi F, MacDonald RG. Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(25): 18647-18656.
11. Brown ES, Allsopp PJ, Magee PJ, Gill CI, Nitecki S, Strain CR, et al. Seaweed and human health. *Nutr Rev* 2014; 72(3): 205-216.
12. Kim NG. Effects of temperature, photon irradiance, and photoperiod on the growth of embryos of *Sargassum horneri* in laboratory culture. *Korean J Fish Aquat Sci* 2015; 48(1): 76-81.
13. Liu L, Heinrich M, Myers S, Dworjany SA. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: a phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol* 2012; 142(3): 591-619.
14. Preeprame S, Hayashi K, Lee JB, Sankawa U, Hayashi T. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001; 49(4): 484-485.
15. Matsumura Y. Nutrition trends in Japan. *Asia Pac J Clin Nutr* 2001; 10 Suppl: S40-S47.
16. McHugh DJ. A guide to the seaweed industry. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2003.
17. Cardoso SM, Pereira OR, Seca AM, Pinto DC, Silva AM. Seaweeds as preventive agents for cardiovascular diseases: from nutrients to functional foods. *Mar Drugs* 2015; 13(11): 6838-6865.
18. Yamaguchi M. Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126(11): 1117-1137.
19. Shao P, Chen X, Sun P. Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*. *Carbohydr Polym* 2014; 105: 260-269.
20. Shao P, Liu J, Chen X, Fang Z, Sun P. Structural features and antitumor activity of a purified polysaccharide extracted from *Sargassum horneri*. *Int J Biol Macromol* 2015; 73: 124-130.
21. Kim DS, Sung NY, Park SY, Kim G, Eom J, Yoo JG, et al. Immunomodulating activity of *Sargassum horneri* extracts in RAW264.7 macrophages. *J Nutr Health* 2018; 51(6): 507-514.
22. Kang BK, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Kim MJ, Bark SW, et al. Immuno-stimulating activities of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice concentrates on mouse macrophages and spleen cells. *Korean J Fish Aquat Sci* 2014; 47(6): 776-784.
23. Shan BE, Yoshida Y, Kuroda E, Yamashita U. Immuno-modulating activity of seaweed extract on human lymphocytes in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21(1): 59-70.
24. Mischell BB, Shiigi SM. Normal peritoneal cells. In: Mischell BB, Shiigi SM, editors. *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco (CA): W. H. Freeman and Company; 1980. p.156.
25. Kim P, Ko SK, Pyo MY. Effects of hot water extract of chaga mushroom on the proliferation and cytokines production of mouse splenocytes in vitro. *Yakhak Hoeji* 2010; 54(3): 187-191.
26. Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, et al. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(7): 1275-1284.
27. Kim BH, Cho DH, Cho JY. 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* 2007; 51(6): 482-489.
28. Virchow JC Jr, Oehling A, Boer L, Hansel TT, Werner P, Matthys H, et al. Pulmonary function, activated T cells, peripheral blood eosinophilia, and serum activity for eosinophil survival in vitro: a longitudinal study in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94(2 Pt 1): 240-249.
29. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151-1164.
30. Byun MW, Byun EH. Immunological synergistic effects of combined treatment with herbal preparation (HemoHIM) and red ginseng extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2015; 44(2): 182-190.
31. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 2001; 69(6): 625-635.
32. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157(1): 87-94.
33. Pyo SN, Son EH. Introduction to immunology. Seoul: Shinil Books; 2008.
34. Lee GN, Kwon OH. Clinical laboratory file. 3rd edition. Seoul: Medical Publisher; 2003.
35. Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A, et al. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(16): 7708-7712.
36. Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 1993; 177(6): 1797-1802.
37. Lee JW, Jang MH, Choi JS, Ahn TW. The effect of Yongyukjo-witang distillate on the immune activity of spleen cells of aged rats. *J Sasang Const Med* 2013; 25(3): 218-232.
38. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17(1): 189-220.
39. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 2012; 91(2): 299-309.
40. Frese-Schaper M, Keil A, Yagita H, Steiner SK, Falk W, Schmid RA, et al. Influence of natural killer cells and perforin-mediated cytolysis on the development of chemically

- induced lung cancer in A/J mice. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63(6): 571-580.
41. Li Q, Morimoto K, Nakadai A, Inagaki H, Katsumata M,

Shimizu T, et al. Forest bathing enhances human natural killer activity and expression of anti-cancer proteins. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20(2 suppl 2): 3-8.