

어성초 추출물 첨가가 마우스 면역능 증진에 미치는 영향

김진^{1,2} · 류혜숙^{1,3} · 신정희⁴ · 김현숙^{1*}

¹숙명여자대학교 식품영양학과, ²한남대학교 식품영양학과
³송의여자대학 식품영양과, ⁴중부대학교 식품영양학과

In vitro and *Ex vivo* Supplementation of *Houttuynia cordata* Extract and Immunomodulating Effect in Mice

Jin Kim^{1,2}, Hye-Sook Ryu^{1,3}, Jung-Hee Shin⁴ and Hyun-Sook Kim^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

³Dept. of Food and Nutrition, Soong Eui Women's College, Seoul 100-751, Korea

⁴Dept. of Health and Nutrition Culinary, Joongbu University, Daejeon 312-702, Korea

Abstract

Houttuynia cordata THNUB (*Hc*; Uh-Sung-Cho) is a medicinal plant which has been widely used as a component of blood-building decoctions. This study was performed to investigate the immunomodulative effect of *Hc* in mice. *In vitro* experiment, the mice splenocytes proliferation and three kinds of cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) production by mice peritoneal macrophages cultured with six (methanol, hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and water) fractions of *Hc* were used to indicate the immunomodulative effect. *Ex vivo* experiment, the different concentrations of *Hc* water extract was orally administrated every other day for two weeks. The production of cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) secreted by activated macrophages and the mice splenocytes proliferation were used as an index for the immunocompetence. The supplementation of all six fractions of *Hc* enhanced the splenocytes proliferation at the level of $6.58 \pm 1.23 \sim 47.82 \pm 5.48$ compared to that of control in the range of 1~50 $\mu\text{g/mL}$. IL-1 β production was significantly increased with the supplementation of chloroform and water extract of *Hc*. Higher level of IL-6 production was detected by the supplementation of ethylacetate, butanol and water extract. TNF- α production was enhanced by the supplementation of all six fractions of *Hc*. From the *ex vivo* study, the highest proliferation of splenocytes was seen from the mice orally administrated with the *Hc* water extract at the concentration of 500 mg/kg bw. In case of cytokines production, IL-1 β , IL-6, and TNF- α release by activated peritoneal macrophages were augmented by the oral administration of *Hc* water extract. These results indicated that *Hc* may enhance the immune function by regulating the splenocytes proliferation and cytokines production capacity in mice.

Key words: splenocytes proliferation, macrophage, cytokine, immunomodulative effect

서론

최근 식품 성분들이 소유한 기존의 영양적 역할 외에 다양한 생리 조절 작용을 밝히려는 노력이 여러 각도에서 이루어지고 있다. 이 중 생명유지와 건강에 가장 기본적인 작용을 하며 암을 비롯한 각종 질환의 발생과 밀접한 관련이 있는 생체 면역능 조절의 기능에 특히 관심을 모으고 있다. 생체 방어체계란 외부로부터 자기 자신을 보호하기 위해 사용되는 생물체의 수단으로, 그 중 면역계는 침입한 항원에 대하여 활성화되는 각종 면역세포들의 작용으로 숙주를 방어한다. 이 면역세포들의 증식, 분화 및 작용기전은 다양한 종류

의 외부자극에 의해 조절, 활성화된다. 이런 관점에서 보아 질병상태는 면역 반응성이 저하된 상태라고 전제하고, 암환자 또는 노약자 등에서 면역반응을 증진시킬 수 있는 물질을 추구하게 되었다. 즉, 면역증강제를 적용하여 면역 반응성을 회복시키거나 증진시킴으로써 질병을 퇴치할 수 있다는 개념이 등장하였다(1). 면역증강제란 면역반응을 향상시키기 위해 복잡한 면역조절계의 하나 또는 그 이상의 구성요소를 간접적인 방법을 통해 조절시키는 방법(2)으로, lentinan, schizophilan, polysaccharide K(PSK), ginsan 등과 같은 식물체의 고분자 물질인 polysaccharide에 의한다고 보고되고 있다(3-7).

*Corresponding author. E-mail: hskim@sookmyung.ac.kr
Phone: 82-2-710-9469, Fax: 82-2-707-0195

어성초는 삼백초과에 속한 다년생 초본인 약모밀(*Houttuynia cordata* THNUB)의 꽃 필 때의 지상부를 채취하여 건조시킨 것으로 물고기향이 특징이다. 본초강목에 따르면 어성초는 사열, 해독, 이뇨, 화농, 해독, 소염 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 임상에서 백일해, 기관지염, 폐렴, 편도선염 등에 응용되고 있고, 한방에서는 만성 피부질환, 이뇨, 소염의 목적으로 사용되고 있다(8). 주요 성분으로는 quercitrin이 함유되어 있고, 근래 연구에 의해 어성초 추출물의 혈압강하작용과 혈당강하작용, 항근작용, 항바이러스 작용, 항암작용, 항염증작용 및 항알레르기성 작용, 항산화 작용 등이 있다고 밝혀졌다(9-12). 면역과 관련된 연구로는 어성초가 마우스 대식세포의 항체생성능을 증진시키고 인체 면역세포의 증식을 향상시킨다는 보고가 있고(13), 비만 세포에서 히스타민을 유리시켜 알레르기 반응을 유발하는 Compound 48/80의 복강 내 주사에 의해 유발되는 전신성 아나필락시 속을 억제한다는 항염증작용에 대한 보고(14), 어성초 추출물에서 분리된 렉틴(lectin) 성분이 사람의 B 림프구와 T 림프구의 활성을 증가시킨다는 보고(15)가 있을 뿐 미흡한 실정이다. 이에, 본 연구에서는 한약재 및 식품성분으로 많이 이용되고 있는 어성초 추출물의 면역활성 증진능을 검색하고자 하였다. 시험관 내(*in vitro*) 실험에서는 어성초의 계통별 추출물 첨가에 의한 마우스 비장세포 증식능과 활성화된 복강 대식세포에서 분비되는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량의 변화를 통해 면역활성 증진효과를 검색하고, 생체 외(*ex vivo*) 실험에서는 어성초 열수 추출물을 경구 투여한 마우스의 비장세포 증식능 및 활성화된 복강 대식세포에서 분비하는 사이토카인의 분비량을 측정하여 어성초 열수추출물이 LPS로 유도된 염증반응에 대한 방어능력을 향상시킬 수 있는지를 검토하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

생후 5~6주령의 숫컷 ICR계 마우스를 (주)대한실험동물센터에서 분양받아 고형사료와 물을 자유롭게 공급하면서 실험실 환경에 적응시킨 후, 건강상태가 양호한 7~8주령(30 \pm 2 g)의 마우스를 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도는 55%로 유지해주고 명암주기(light and dark cycle)는 12시간 간격으로 조절하였으며, 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시료 제조

실험재료인 어성초(*Houttuynia cordata* THNUB)는 강원도 홍천에서 채취하여 건조시킨 것을 서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 건조 분말화한 시료를 메탄올 또는 증류수로 80 $^{\circ}$ C 수욕상에서 환류 냉각하면서 3시간씩 3회 반복 추출하여 여과한 후, rotary evaporator(EYELA N-1N, Japan)로 60 $^{\circ}$ C에서 감압 농축하여 메탄올 추출물과 열수 추

출물을 각각 얻었다. 메탄올 추출물은 증류수에 현탁한 후 Fig. 1과 같이 핵산을 가하여 분획한 후 여과, 감압 농축하여 분획물을 얻었다. 이와 같은 방법으로 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 추출물로 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 6개의 분획을 얻었다. 제조된 6개의 분획 추출물들은 세포배양액(10% FBS-RPMI 1640; GIBCO)에 용해시킨 후 시험관 내(*in vitro*) 실험에, 열수 추출물은 멸균 증류수로 희석하여 생체 외(*ex vivo*) 실험에 각각 사용하였다.

시료의 투여

시험관 내 실험에서는 어성초의 6개 분획 추출물(methanol, hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, water)을 세포배양액(10% FBS-RPMI 1640; GIBCO)에 용해시킨 다음 실험하고자 하는 농도가 되도록 희석하여 세포 배양시 첨가하였다.

생체 외 실험에서는 어성초 열수 추출물을 멸균 증류수로 용해시킨 후 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 마우스를 임의배치법에 의해 대조군과 투여군으로 나누었으며, 실험군마다 6마리씩 사용하였다. 대조군에는 멸균 증류수를, 투여군에는 검액을 각각 20, 100, 500, 1000 mg/kg bw/day씩 14일간 격일로 경구 투여하였다.

어성초 추출물과 비장세포 증식능

마우스 비장세포의 분리 및 배양: 마우스 비장세포의 분리는 Mishell과 Shiigi(16)의 방법에 의해 시행하였다. 경추 탈골법으로 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 빙냉의 RPMI 1640으로 씻은 다음 멸균 유리병으로 가볍게 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 잘 분리된 세포 현

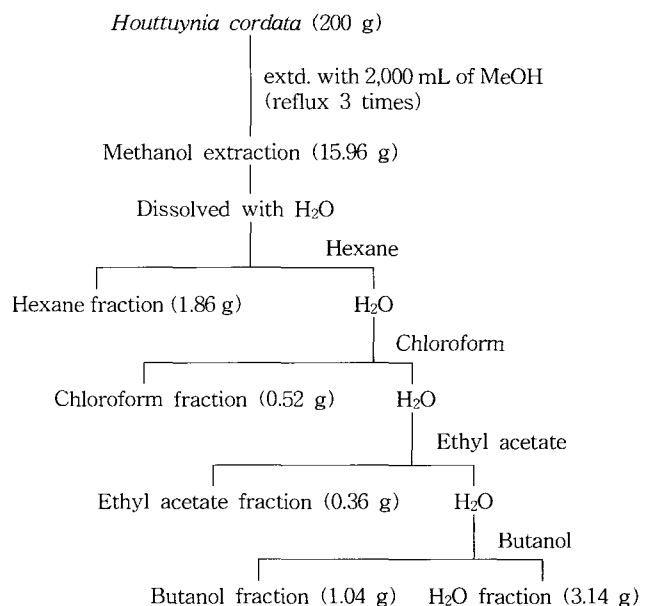


Fig. 1. Schematic diagram for solvent fractions from methanol extract of *Houttuynia cordata*.

탁액을 200-mesh 철망에 통과시켜 세포 debris를 제거시켰다. 이 세포 현탁액을 원심분리관(Corning, USA)에 옮겨 3000 rpm으로 10분간 원침시킨 후 cell pellet을 lysing buffer (Tris-buffered ammonium chloride; 0.87% NH₄Cl, pH 7.2)에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하고 다시 원심세척한 다음, 10% FBS-RPMI 1640으로 5×10⁶ cells/mL가 되도록 희석하여 96-well plate에 90 μL씩 분주한 후 세포 증식능 측정에 이용하였다.

비장지수(spleen index) 산정 : 무균적으로 비장을 적출하여 비장의 무게를 측정된 뒤, 실험동물 체중의 차이에 따른 변이를 없애고 이를 표준화하기 위하여 적출비장의 무게와 마우스의 체중을 바탕으로 아래의 공식에 따라 비장지수를 구하였다(17).

$$\text{비장지수} = \sqrt{\frac{\text{비장무게}(g) \times 100}{\text{마우스 몸무게}(g)}}$$

어성초 추출물이 시험관 내에서 비장세포 증식능에 미치는 영향 : 준비된 96-well plate에 마우스 비장세포 90 μL와 최종농도가 1, 10, 50, 100, 250 μg/mL가 되도록 조제된 어성초 추출물을 10 μL씩을 각 well에 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator(Sanyo, Japan)에서 48시간 배양하였다. 비장세포의 증식정도는 생존세포의 효소작용에 의해 MTT 시약이 환원되어 생성되는 formazan의 양을 측정함으로써 세포 독성 연구에 자주 사용되며 ³H-thymidine uptake assay의 결과와 유사한 것으로 보고된(18) MTT assay(19,20)를 이용하여 측정하였다. 즉, 비장세포의 증식을 조사하기 위해서 44시간 되었을 때 각 well에 10 μL의 MTT를 가한 후, 알루미늄 호일로 plate를 싸서 빛을 차단한 상태에서 다시 4시간 동안 배양하여 formazan crystal 형성을 유도하였다. 배양이 끝난 후 plate를 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 조심스럽게 제거한 후 각 well당 150 μL의 DMSO를 가하여 10분간 방치한 다음 ELISA reader를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 비장세포 증식능은 다음의 공식에 의해서 계산하였다.

$$\text{Proliferation (\%)} = \frac{\text{Sample의 흡광도}}{\text{Control의 흡광도} - 1} \times 100$$

어성초 열수 추출물의 경구 투여가 비장세포 증식능에 미치는 영향 : 각 군별로 마우스 비장세포 현탁액을 5×10⁶ cells/mL 되도록 희석하여 96-well plate에 90 μL씩 분주하고 각 군 당 positive control로서 ConA(5 μg/mL), LPS(15 μg/mL)를 10 μL씩 분주하고 대조군에는 배지를 동량 분주하였다. 각 plate는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양한 후 MTT assay에 의해 비장세포 증식계수(proliferation index)를 구하였다.

$$\text{Proliferation Index} = \text{Sample의 흡광도} / \text{Control의 흡광도}$$

어성초 추출물과 대식세포의 활성 증진능

복강대식세포의 분리 및 배양 : Mishell과 Shiigi(16)의

방법에 따라 마우스 복강내에 4% thioglycollate(Difco, USA) 2 mL를 주사하여 3일간 복강 대식세포가 모이도록 방치한 뒤 경추 탈골법으로 희생시킨 후 복부를 열어서 RPMI 1640으로 복강을 세척하여 대식세포를 수집하였다. 4°C, 3000 rpm에서 10분간 원심 세척한 후 cell pellet을 lysing buffer에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하고 다시 원심 세척한 다음, 10% FBS-RPMI 1640으로 1×10⁶ cells/mL가 되도록 희석하여 24-well plate에 1000 μL씩 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 방치한 후, 각 well의 상층액을 걸어내어 비부착성 세포(non-adherent cells)는 제거하고 부착성 세포(adherent cells)만을 사용하였다.

복강대식세포의 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α) 분비량 측정 : 대식세포의 면역능 측정은 각각의 어성초추출물 첨가에 의해 활성화된 대식세포로부터 분비된 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α)을 측정하였다. 비부착성 세포를 제거하고 부착성 세포만을 얻은 후, 10% FBS-RPMI 1640 900 μL와 각 추출물을 100 μL씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 상층액을 분리하여 Mouse ELISA 사이토카인 kit(Intergen Inc., USA)를 이용하여 IL-1β, IL-6, TNF-α의 분비량을 측정하였다.

통계분석

모든 연구 결과의 자료는 통계 프로그램인 SAS(Statistic Analysis System)를 이용하여 평균과 표준편차를 구하였다. 군간의 비교에서 각각의 요인은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 사용하였고, Duncan's multiple range test로 α-0.05 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

어성초 분획물에 의한 비장세포 증식 효과

시험관 내에서 정상 마우스의 비장세포에 어성초의 메탄올 추출물을 비롯한 6가지 분획물 추출물을 첨가하여 증식능을 실험하고, 양의 대조군(positive control)으로는 T 림프구를 자극하는 ConA(Concanavalin A)와 B 림프구를 자극하는 LPS(lipopolysaccharide)(21)를 각각 5 μg/mL, 15 μg/mL의 농도로 첨가하여 배양하였다. 비장세포의 증식정도를 MTT assay로 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다. ConA와 LPS를 첨가하여 배양한 경우 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 세포증식능이 각각 52.75±1.25%, 43.39±2.85%의 증가를 보였다. 어성초 추출물에 의한 비장세포 증식능의 변화를 살펴보면, 50 μg/mL 이하의 농도에서는 모든 분획의 첨가시 세포 증식능이 6.58±1.23~47.82±5.48% 수준으로 향상되었으나, 100 μg/mL 이상의 고농도 첨가시에는 메탄올, 부탄올, 물 층을 제외한 모든 군에서 비장 세포 증식이 억제되었다(Table 1). 식물 추출물의 분획물 추출물에 의한 비장세포 증식능을 측정된 몇몇 연구에서는 250 μg/mL 이상의 고농도 처리시 세포 증식능이 억제됨을 보고하였

Table 1. Proliferation¹⁾ of mice splenocytes cultured with six different fractions of *Houttuynia cordata* extracts or mitogens

Conc. (µg/mL)	Fractions of <i>Houttuynia cordata</i>					
	Methanol	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water
10	9.34±2.53 ²⁾	25.12±2.94	6.58±1.23	10.36±1.37	9.73±2.40	8.42±0.41
50	33.83±2.26	47.82±5.48	2.90±2.60	- 4.11±3.90	11.62±1.92	8.28±12.94
100	32.38±0.34	-34.37±13.83	-43.18±0.96	- 9.97±0.00	42.11±0.55	11.28±1.02
250	-83.49±6.23	-89.74±0.27	-88.38±0.64	-66.36±0.34	17.33±0.96	13.17±4.11
500	-88.92±0.48	-87.51±0.14	-88.48±0.55	-58.18±1.92	-32.48±2.12	4.50±0.62
1000	-87.27±1.16	-73.38±3.15	-87.27±1.57	-49.56±2.33	-43.22±0.07	-2.03±2.60
ConA	52.75±1.25					
LPS	43.39±2.85					
Control	0					

¹⁾Proliferation (%)=(mean of O.D. in test wells/mean of O.D. in control wells-1)×100.

²⁾Values are mean±SD of triplicates.

는데, Lee(22)는 맨드라미의 분획별 추출물 처리시 메탄올, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 층에서 -15.66~ -82.71%의 세포 생존율을 보였음을 보고하였고, *Discopodium penninervium*으로 추출한 withanolides 첨가시 100 µg/mL 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 비장세포 증식 능이 감소하였다. 한편, 물 층의 경우 250 µg/mL 이하에서는 농도에 비례하여 세포 증식능이 향상되었고, 500 µg/mL 농도로 첨가한 경우에도 세포 증식이 촉진되었는데(4.50±0.62%), 이러한 경향은 숙단, 솔잎, 맨드라미 등의 식물의 분획별 추출물 첨가에 의한 비장세포 증식능을 측정할 연구와 유사하였다(22-24).

어성초 분획물에 의한 사이토카인 분비능

어성초 분획별 추출물에 의한 마우스 복강 대식세포 활성화에 대한 지표로 사이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α)의 분비량을 측정하였으며 그 결과는 Fig. 2~4에 나타내었다. 대식

세포는 외부로부터의 자극에 의해서 활성화되면 탐식능력과 종양세포 파괴의 기능이 항진되며(25), 세포의 크기가 증가되고 사이토카인과 같은 여러 가지 세포분비물이 증가하게 된다. 그 중에서도 IL-1, IL-2, IL-6, TNF 등이 영양과 관련하여 많이 연구되고 있고(26), 그 중 IL-1β, IL-6, TNF-α는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 주요 사이토카인으로 알려져 있다(27,28).

활성화된 대식세포에서 첫 번째로 분비되는 대표적인 사이토카인인 IL-1β(29)의 경우, 클로로포름 층과 물 층에서는 모든 농도 (1, 10, 100 µg/mL)에서 대조군(0.20±0.08 ng/mL)에 비해 많은 양의 IL-1β가 분비되었고, 특히 클로로포름 층에서는 그 수치가 모두 유의적(p<0.05)으로 높았고(5.18 ng/mL, 3.63 ng/mL, 2.68 ng/mL), 물 층의 경우에는 100 µg/mL 농도에서 대조군에 비해 분비량이 유의적(p<0.05)으로 향상되었다(3.13±0.38 ng/mL). 에틸아세테이트 층과 부탄

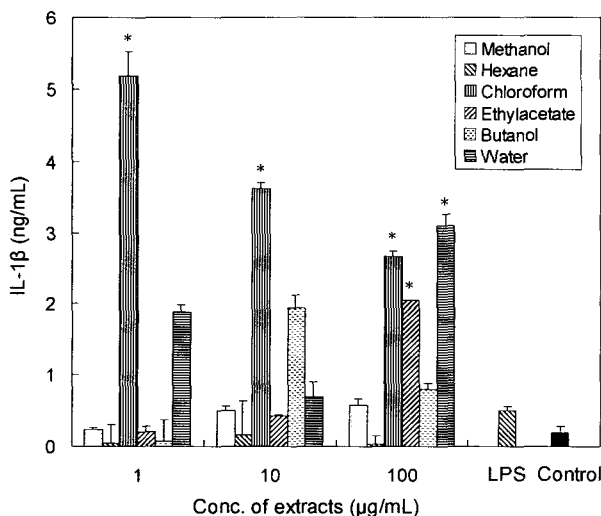


Fig. 2. IL-1β production by mice peritoneal macrophage cultured with six different fractions of *Houttuynia cordata* extracts.

The data present the mean values±SD, n=3.

*Significantly different at p<0.05 compared to control.

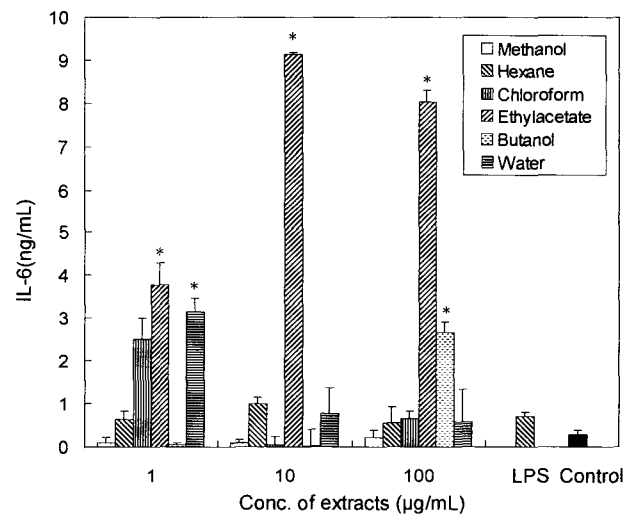


Fig. 3. IL-6 production by mice peritoneal macrophage cultured with six different fractions of *Houttuynia cordata* extracts.

The data present the mean values±SD, n=3.

*Significantly different at p<0.05 compared to control.

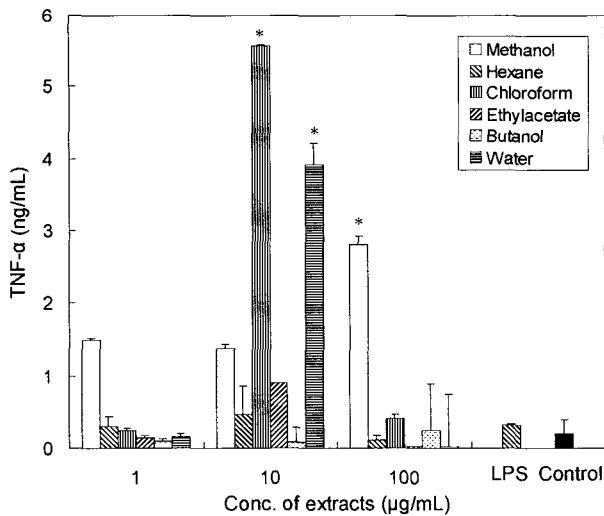


Fig. 4. TNF- α production by mice peritoneal macrophage cultured with six different fractions of *Houttuynia cordata* extracts.

The data present the mean values \pm SD, n=3.

*Significantly different at $p < 0.05$ compared to control.

을 층에서는 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 IL-1 β 분비능이 향상되었으나 유의적이지는 않았다. Koji 등(30)은 개맨드라미(*Celosia argentea*)의 씨로부터 추출한 celosian을 다양한 농도로 첨가하여 IL-1 β 생성 유도를 확인한 연구에서 10 $\mu\text{g/mL}$ 첨가군에서 대조군의 65 pg/mL 에 비해 유의적으로 높은 ($p < 0.001$) 양인 201 pg/mL 을 생성하였다고 보고하였다.

IL-6의 경우, 에틸아세테이트 분획물에서는 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군(0.02 \pm 0.00 g/mL)에 비해 유의적으로 많은 양인 3.78 \pm 1.98 ng/mL , 9.14 \pm 1.99 ng/mL , 8.05 \pm 9.63 ng/mL 를 각각 분비하였다($p < 0.05$). 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 부탄올 분획물 첨가와 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 물 분획물 첨가시에도 유의적으로 많은 양(2.66 \pm 3.75 ng/mL , 3.15 \pm 1.28 ng/mL)의 IL-6를 분비하였다($p < 0.05$). 솔잎의 분획별 추출물을 첨가하여 IL-6 분비량을 측정된 연구에서는 100 $\mu\text{g/mL}$ 첨가시 클로로포름, 메탄올, 부탄올, 헥산 층에서 대조군(26.39 \pm 3.03 pg/mL)에 비해 유의적으로 높은 분비량을 보였고, 특히 chloroform 층에서 가장 높은 생성을(1147.82 \pm 15.66 pg/mL)을 보였으나, 에틸아세테이트 분획물에 의한 IL-6 분비능 상승 효과는 나타나지 않아 각 시료에 따른 차이를 보였다(24).

어성초 추출물을 첨가한 결과 비교적 높은 수준의 TNF- α 가 분비됨을 볼 수 있었다. 10 $\mu\text{g/mL}$ 첨가시 부탄올 층을 제외한 모든 층에서 대조군보다 많은 양의 TNF- α 를 분비하였고, 특히 클로로포름 층과 물 층에서는 대조군(0.21 \pm 0.18 ng/mL)에 비해 유의적인 수준($p < 0.05$)인 5.58 \pm 0.74 ng/mL , 3.92 \pm 4.97 ng/mL 의 TNF- α 를 각각 분비하였다. 영지버섯 다당체가 마우스 대식세포의 TNF- α 생성에 미치는 효과를 확인한 결과 현저한 증가를 보이는 결과를 확인하였다(31). 뽕장 추출물 및 영지버섯 다당체를 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가한 경우 TNF- α 분비량이 대조군에 비해 상승하였

다(32-33). 반면, 양파, 마늘 속에 들어있는 바이오 플라보노이드의 일종인 퀘세틴(querctetin)을 첨가한 마우스 대식세포의 TNF- α 의 함량을 측정된 결과 생성을 억제시키는 것으로 나타났다(34). 솔잎의 부탄올 추출물을 첨가한 경우에도 대조군과 거의 유사한 양의 TNF- α 를 분비하여 유의적인 영향을 주지 못하는 것으로 관찰되었고(35), 들깨와 탈지 들깨의 물 추출물을 첨가한 경우에도 역시 TNF- α 의 양이 급격히 감소하는 것이 보고되었다(36). 이상의 결과에 의하면 어성초의 분획 추출물 중 IL-1 β 와 TNF- α 는 클로로포름 층과 물 층에서 대조군에 비해 유의적으로 많은 양이 분비되었고($p < 0.05$), IL-6는 에틸아세테이트, 부탄올, 물 층에서 대조군에 비해 유의적으로 향상되어($p < 0.05$) 각 분획물에 따라서 사이토카인 분비의 정도가 다른 것으로 나타났다.

어성초 경구투여가 비장세포 증식능에 미치는 영향

비장 무게 : 비장지수(spleen weight index)는 비장의 무게를 표준으로 환산하여 측정 지표로 삼는 것으로 비장의 무게에 대한 체중의 비로 나타낸다. 세포 매개성 면역반응인 GVH 반응(graft-versus-host reaction)에서는 비장을 비정상적인 증대가 지표가 되므로 Spleen Index가 1.3 이상일 때 양성 반응으로 결정하기도 하고(21), 각 실험군마다 spleen weight index를 구하여 대조군의 값과 비교하여 이상유무를 판단하기도 한다(37). 본 연구에서 측정된 대조군과 실험군의 spleen weight index 및 spleen index는 Table 2와 같다.

마우스 비장세포 증식능 측정 : 식이 섭취가 생체 내에 미치는 영향을 알아보기 위한 방법으로 장기 혹은 혈액을 채취하여 시험관 내 실험을 하는 연구가 다양하게 진행되고 있다(38-40). 이 중 비장세포는 면역 반응과 밀접한 관련을 나타내며 그 크기나 세포의 수가 직접적인 지표로 이용될 수 있어 대표적인 면역 지표로 사용된다(37,40). 시험관 내 실험 결과 어성초의 물 추출물이 마우스 비장세포 증식능에 영향을 미치는 것으로 나타났으므로, 이 결과를 바탕으로 어성초 열수 추출물 투여에 의한 비장세포 증식능을 살펴보았다. 일단, 추출물을 투여한 군과 투여하지 않은 대조군으로 나누어 비장세포 증식능을 측정하였고, 세포 배양시 미토

Table 2. Spleen index of the mouse orally administered with various concentrations of *Houttuynia cordata* water extracts

Concentration (mg/kg bw)	Spleen-weight index ¹⁾	Spleen index ²⁾
0	0.332 \pm 0.027	
20	0.433 \pm 0.117	1.225 \pm 0.459
100	0.453 \pm 0.234	1.214 \pm 0.428
500	0.408 \pm 0.120	1.212 \pm 0.472
1000	0.416 \pm 0.163	1.057 \pm 0.508

¹⁾ $\frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}} \times 100$

²⁾ $\frac{\text{Mean of (spleen-weight index) in test group}}{\text{Mean of (spleen-weight index) in control group}}$

Table 3. Effect of mitogen on the proliferation of splenocytes isolated from mice orally administrated with different levels of *Houttuynia cordata* extracts

Concentration (mg/kg bw)	Proliferation (%) ¹⁾		
	Without mitogen	ConA treated	LPS treated
0	0 ²⁾	24.4±0.6	28.9±1.6
20	20.7±3.5*	20.6±2.7	4.1±2.3
100	8.9±1.5	21.8±2.0	37.8±3.5*
500	0.1±3.3	35.9±3.4*	45.6±1.6*
1000	0.1±2.4	4.5±1.3	11.4±2.1

¹⁾Proliferation (%)=(mean of O.D. in test wells/mean of O.D. in control wells-1)×100.

²⁾Values are mean±SD of 6 mice.

*Significantly different from control within every mitogen treated group at p<0.05.

젠인 ConA(5 µg/mL)과 LPS(15 µg/mL)를 각 well에 첨가하였고 이에 대한 대조군으로는 미토젠 대신 세포배양액을 동량 첨가하여 비장세포 증식계수를 구하여 비교하였다. 실험 결과(Table 3), 어성초 추출물을 투여하고 미토젠을 처리하지 않은 경우에는 세포증식능이 농도에 비례하여 저하되었으나, ConA나 LPS로 처리시에는 500 mg/kg bw 군에서 각각 최대의 증식능(35.9±3.4%, 45.6±1.6%)을 보였다. Song과 Shin(41)은 암발생 마우스에 어성초 추출물을 경구 투여한 결과 세포성면역과 체액성면역 증진효과를 보고하였고, Chun(15)은 B세포를 활성화시켜 세포 분화를 증가시키고 T세포에 대한 세포 증식능을 향상시킨다고 보고하여 어성초 추출물 투여가 마우스의 면역기능을 상승시킴을 시사하였다. 한편, 미토젠과 관련하여 Cho 등(42)은 다시마 분말 투여에 의한 당뇨쥐의 비장세포기능에 관한 연구에서 4주간의 투여에 의해 비당뇨군의 비장세포 증식능이 촉진되었고, 특히 LPS와 ConA 첨가에 의해 비장세포 증식능이 3배까지 상승하였음을 보고하였고, 동충하초를 4주간 투여한 마우스의 비장세포를 미토젠과 같이 배양시 비장세포 증식능이 상승하였음이 보고되었다(43).

어성초 열수추출물이 마우스 복강대식세포의 사이토카인 분비능에 미치는 영향

대식세포가 활성화되고 종양세포치사 대식세포가 되기 위해서는 먼저 T-림프구에서 분비된 IFN-γ 나 염증환경이 필요하고, 그 다음에 LPS와 같은 박테리아 유래 물질이 필요한 것으로 알려져 있다. 이렇게 활성화된 종양세포치사 대식세포는 IL-1β, IL-6, TNF-α 와 같은 사이토카인과 일산화질소(nitric oxide, NO) 등의 물질을 분비하며 이러한 물질들을 동물에 투여했을 때 바이러스나 암에 대한 저항성을 증가시킨다고 보고되었다(44-47). 어성초 열수 추출물을 경구 투여한 마우스로부터 복강대식세포를 분리해 낸 다음 대식세포가 생성한 IL-1β, IL-6, TNF-α 의 분비량을 측정 한 결과는 Fig. 5~7과 같다. IL-1β는 모든 투여군에서 대조군에 비해 낮은 수준의 IL-1β가 분비되었고, 이러한 경향은 ConA와 LPS를 처리한 경우에도 동일하여 어성초 열수 추

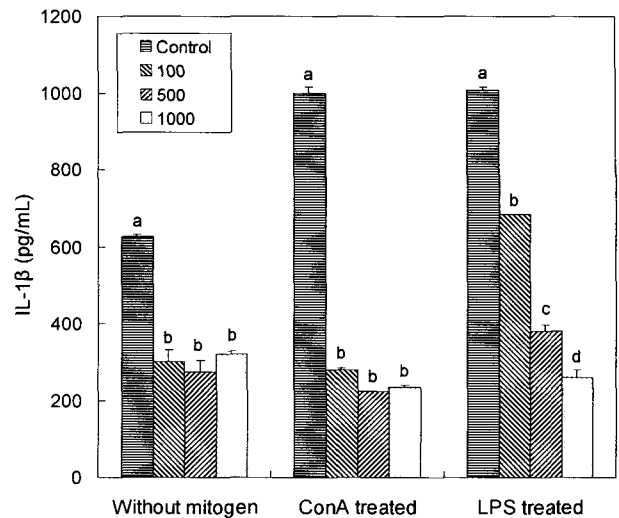


Fig. 5. IL-1β production by activated peritoneal macrophage of mice orally administered with different levels of *Houttuynia cordata* water extract treated with or without mitogen.

The data present the mean values ±SD, n=6. With different letters within every mitogen groups are significantly different from each other at α=0.05 as determined by Duncan's multiple range test (a>b>c>d).

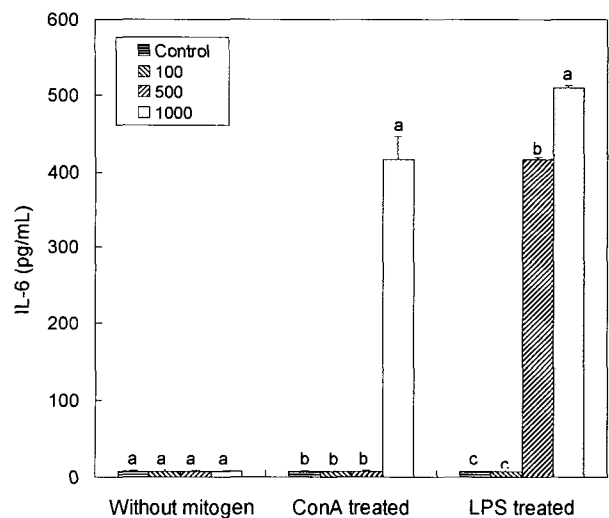


Fig. 6. IL-6 production by activated peritoneal macrophage of mice orally administered with different levels of *Houttuynia cordata* water extract treated with or without mitogen.

The data present the mean values ±SD, n=6. With different letters within every mitogen groups are significantly different from each other at α=0.05 as determined by Duncan's multiple range test (a>b>c).

출물 투여는 마우스의 IL-1β 분비에 영향을 주지 않는 것으로 보인다. 이런 결과는 탁월한 진통 효과로 생약제제에 많이 사용되는 현호색(Corydalis Tuber)의 메탄올 추출물을 투여한 마우스 대식세포의 IL-1β 분비를 관찰한 연구에서 30, 100, 300 mg/kg bw 농도 투여군에서 모두 대조군보다 낮게 분비한 것과 비슷한 경향이다(48).

어성초 열수 추출물 투여에 의한 IL-6 분비 수준의 변화

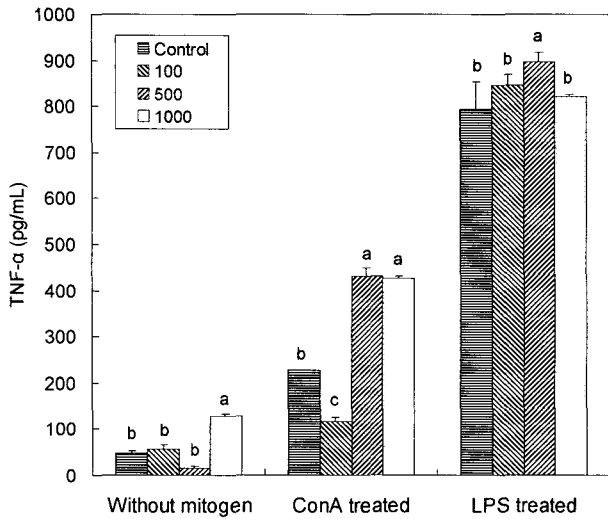


Fig. 7. TNF- α production by activated peritoneal macrophage of mice orally administered with different levels of *Houttuynia cordata* water extract treated with or without mitogen.

The data present the mean values \pm SD, n=6. With different letters within every mitogen groups are significantly different from each other at $\alpha=0.05$ as determined by Duncan's multiple range test (a>b>c).

를 살펴보면, 미토젠을 처리하지 않은 경우에는 대조군(6.66 \pm 1.2 pg/mL)을 비롯한 모든 군에서 극히 미량의 IL-6(7.01 \pm 1.2~7.27 \pm 1.1 pg/mL)가 분비되었다. ConA 자극시에는 1,000 mg/kg bw(416.77 \pm 29.57 pg/mL; 대조군 6.66 \pm 1.2 pg/mL)의 농도에서, LPS 자극시에는 500 mg/kg bw(416.10 \pm 2.5 pg/mL)과 1,000 mg/kg bw(510.0 \pm 3.5 pg/mL)에서 각각 대조군에 비해 유의적으로 많은 양의 IL-6가 분비되었다 (p<0.01). 맨드라미 열수 추출물과 숙단 에탄올 추출물을 각각 경구 투여한 후 LPS로 자극한 마우스 대식세포에 의한 IL-6 분비를 관찰한 연구에서 100 mg/kg bw 이상의 농도에서 대조군에 비해 분비량이 증가하는 것으로 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다(22,23).

어성초 열수 추출물의 경구 투여에 의한 TNF- α 분비 변화를 살펴보면, 미토젠을 처리하지 않은 경우 대조군과 유의적인 차이가 없었으나, LPS 처리시에는 500 mg/kg bw (430.24 \pm 18.97 pg/mL) 농도군과 1000 mg/kg bw(425.55 \pm 6.32 pg/mL) 농도군에서 대조군(227.46 \pm 0.66 pg/mL)에 비해 유의적으로 높은 수준의 TNF- α 가 분비되었다(p<0.05). 비슷한 투여 효과를 보인 맨드라미 열수 추출물을 경구 투여한 연구에서는 LPS에 의해 유도된 경우의 TNF- α 분비는 유의적으로 향상시키는 반면, ConA에 의해 유도된 TNF- α 분비는 유의적으로 억제시키는 것으로 나타났다(22). 또한 우황을 10 mg/kg/day씩 경구 투여한 Son 등(48)의 연구에서도 LPS와 IFN- γ 로 활성화시켰을 때 대조군에 비해 유의적으로 많은 양의 TNF- α 를 분비한 것으로 보고되었고, 탈지 들깨 물추출물을 식이로 첨가한 연구에서도 역시 LPS로 자극했을 때 유의적으로 높은 양의 TNF- α 가 분비됨을 보

고하였다(36). 이들 결과를 살펴보면, LPS나 IFN- γ 등의 물질에 의한 자극에 의해서 대식세포가 활성화되어 TNF- α 와 같은 사이토카인의 분비량이 상승하고, 자극이 없는 경우에는 본 실험의 결과에서와 유사하게 사이토카인이 극히 미량 분비되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 식이로 투여한 어성초를 포함한 각각의 식물 추출물 및 분말이 직접적으로 생체의 염증반응을 유발한 것은 아니고, IFN- γ 와 LPS와 같은 면역조절제에 의해 대식세포가 자극되었을 때 사이토카인 분비량을 증가시킴으로서 면역 반응을 상승시키는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 우리나라 야산에서 손쉽게 구할 수 있는 구황식물인 어성초를 이용하여, 시험관 내 실험 및 생체 내 실험을 실시하여 어성초의 면역증강제로서 가능성을 살펴보았다. 시험관 내 실험에서는 건조시켜 분쇄한 어성초를 메탄올로 추출한 후 극성에 따라 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 순으로 계층추출하여 비장세포 증식능과 복강대식세포에 의한 사이토카인 분비능을 측정하였다. 그 결과, 비교적 극성이 높은 부탄올 분획물과 물 분획물 첨가에 비장세포 증식능이 250 μ g/mL의 농도군에서까지 향상됨을 볼 수 있었다. IL-1 β 와 TNF- α 는 클로로포름과 물 추출물을 첨가했을 때 대조군에 비해 유의적으로 많은 양이 분비되었고, IL-6는 에틸아세테이트, 부탄올, 물 층에서 대조군에 비해 유의적으로 향상되었다. 이들 세가지 사이토카인의 분비 수준은 모두 B 림프구를 자극하는 미토젠인 LPS보다는 높았으므로, B 림프구 자극 효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 시험관 내 실험의 결과를 토대로 하여 2주간 격일로 어성초 열수 추출물을 마우스에게 직접 경구 투여하고 비장세포 증식능과 활성화된 복강 대식세포에 의한 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 분비량을 측정하였다. 그 결과 비장세포 증식능은 ConA와 LPS로 처리시 어성초 추출물을 500 mg/kg bw 농도로 투여한 군에서 각각 최대의 비장세포 증식을 보였다. 활성화된 복강 대식세포에 의한 사이토카인 분비량을 측정된 결과 500 mg/kg bw와 1000 mg/kg bw의 농도로 투여시 대조군에 비해 유의적으로 많은 양의 IL-6를 분비하였고, 500 mg/kg bw 투여군에서 대조군에 비해 많은 양의 TNF- α 를 분비하였다. 그러나, IL-1 β 의 분비량은 대조군에 비해 오히려 급격히 감소하는 것으로 나타나 어성초의 투여가 IL-1 β 분비를 자극하지는 못하는 것으로 나타났다. 따라서 어성초 열수 추출물을 생체내에 적용시켰을 때 비장세포의 증식을 유도하고 복강 대식세포를 활성화시켜 IL-6와 TNF- α 의 분비를 촉진시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 적정량은 500 mg/kg bw 정도인 것으로 사료된다. 비장세포 증식능과 복강 대식세포 활성화를 통한 연구 결과에 의하면 어성초는 비교적 극성이 높은 용매에 용해되는

부분에 면역증강효과가 있는 물질이 함유되어 있는 것으로 판단된다. 따라서, 앞으로는 그 성분에 대한 순수 분리 및 이를 동정하는 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것으로 보이고, 이는 식품소재개발에 있어서 중요한 기초 자료가 될 것으로 보인다.

문 헌

- Galbraith GM. 1998. Therapeutic immunomodulation. *Dermatol Clin* 6: 561-568.
- Gatenby PA. 1992. Immunopotential. In *Encyclopedia of immunology*. Roitt IM, Delves PJ, eds. Academic Press, London. p 847-852.
- Maeda YY, Watanabe ST, Chihara G, Rokutanda M. 1984. T-cell mediated vascular dilatation and hemorrhage induced by antitumor polysaccharide. *Intl J Immunopharmacol* 6: 493-501.
- Akiyama J, Kawamura T, Gotohda E, Yamada Y, Hosokawa M, Kodama T, Kobayashi H. 1977. Immunotherapy of transplanted KMT-17 tumor in rats by combination of cyclophosphamide and immunostimulatory protein-bound polysaccharide isolated from basidiomycetes. *Cancer Res* 37: 3042-3045.
- Tsuru S, Nomoto K. 1983. Effect of PSK on specific tumor immunity to syngeneic tumor cells. *J Clin Lab Immunol* 4: 215-219.
- Yun YS, Lee YS, Jo SK, Jung IS. 1993. Inhibition of autochthonous tumor by ethanol insoluble fraction from Panax ginseng as an immunomodulator. *Planta Medica* 59: 521-524.
- Kim KH, Lee YS, Jung IS, Park SY, Chung HY, Lee IR, Yun YS. 1998. Acidic polysaccharide from Panax ginseng, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. *Planta Medica* 64: 110-115.
- Yoo HT, Noh JS, Lim YD. 1977. *Hyangyak Jipsungbang*. Haenglim Publishing Co., Seoul. p 717-718.
- Wang YS. 1983. *Jungvi Yakli Yo Yngyong*. People's Sanitation Publishing Co., Peking. p 709-710.
- Song JH, Kim MJ, Kwon HD, Park IH. 2003. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1053-1058.
- Chung CK, Ham SS, Lee SY, Oh DH, Choi SY, Kang IJ, Nam SM. 1999. Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat die. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 205-211.
- Choi YH, Kim EY, Park EY, Rhee SH, Lee WH. 1994. Antimutagenic effects of the juice and boiling water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 916-921.
- Kim HJ. 2000. Biological effects of *Houttuynia cordata* Thunb extract on murine and human immune system. *MS Thesis*. Seoul National University.
- Rho BG, Shin MK, Song HJ. 1998. Studies on the antiallergic reactions of the *Herba Houttuyniae* extract. *Kor J Herbolgy* 13: 77-89.
- Chun EY. 1997. Partial purification of *Houttuynia cordata* Thunb extract and characterization of its immunological activities in human. *MS Thesis*. Seoul National University.
- Mishell BB, Shiigi SM. 1980. *Selected methods in cellular immunology*. 1st ed. WH Freeman Co., Sanfrancisco. p 4-27.
- Collins FM, Congdon CC, Morrison NE. 1975. Growth of mycobacterium bovis (BCG) in T lymphocyte-depleted mice. *Infect Immun* 11: 57-64.
- Roh JK, Chung HC, Koh EH, Lee YY, Hahn JS, Kim BS. 1991. *In vitro* cytotoxicity of various anticancer drugs to short-term cultured gastric adenocarcinoma cell lines. *J Korean Cancer Assoc* 23: 495-516.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Konic V, Fleischmann JWR. 1990. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J Immunol Methods* 129: 23-30.
- Kuby J. 1997. *Immunology*. 3rd ed. WH Freeman & Co., New York.
- Lee YK. 2001. A study of immunomodulating effects and production of nitric oxide by *C. cristata* L. extracts in mice. *MS Thesis*. Sookmyung Women's University.
- Kim SH. 2000. The effect of ethanol extract of *Phlomis umbrosa* on splenocyte proliferation and cytokine production. *MS Thesis*. Sookmyung Women's University.
- Lee JH. 2001. Effect of pine needle extracts and powder on modulation of immunocompetence in mice and human subjects. *DS Thesis*. Sookmyung Women's University.
- Adams DO, Hamilton TA. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 2: 283-318.
- Meydani SN. 1990. Dietary modulation of cytokine production and biologic function. *Nutr Rev* 48: 361-369.
- Munoz C, Schlesinger L. 1995. Interaction between cytokine, nutrition and infection. *Nutr Res* 15: 1815-1844.
- Yujian W, Dennis SH, Cleamond DE, Ronald RW. 1994. Long term dietary vitamin E retard development of retrovirus-induced dysregulation in cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol* 72: 70-75.
- Dinarelo CA. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-1652.
- Koji H, Purusotam B, Shigetoshi K, Tsuneo N. 1997. Immunostimulating activity of Celosian, an antihepatotoxic polysaccharide isolated from *Celosia argentea*. *Planta Medica* 63: 216-219.
- Kim SW, Kim ES. 1997. Studies on the immunomodulating effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *Korean J Immunol* 26: 148-153.
- Lee BK, Jang YS, Yi SY, Chung KS, Choi SH. 1997. Immunomodulators extracted from Korean-styole fermented soybean paste and their function. *Korean J Immunol* 19: 559-569.
- Bae JH. 1997. Effects of *Ganoderma lucidum* on the IL-1, TNF and IL-12 gene expression of macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 978-982.
- Manjee KR, Ghosh B. 1999. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. *Int J Immunopharmacol* 21: 435-443.
- Choi SE. 2000. Effect of pine needle extracts on splenocyte proliferation and cytokine production by mouse peritoneal macrophages. *MS Thesis*. Sookmyung Women's University.
- Hur SY. 1997. Immunomodulative effect of *Perilla frutescens* seeds extracts. *MS Thesis*. Sookmyung Women's University.
- Zalys R, Zagon IS, Bonneau RH, Lang CM, McLaughlin PJ. 2000. *In vivo* effect of chronic treatment with (MET5)-enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Sci* 66: 829-834.
- Hasegawa T, Ito K, Ueno S, Kumamoto S, Ando Y, Yamada

- A, Nomoto K, Yasunobu Y. 1999. Oral administration of hot extract of *Chlorella vulgaris* reduce IgE production against mile casein in mice. *Int J Immunopharmacol* 21: 311-323.
39. Hiroichi N, Takeshi N, Takeshi O, Yoshiki I, Hiroyuki T, Naoki I. 1999. The effect of methanolic extract from *Cordalis tuber* on cytokine production and allergic reactions in experimental animal. *J Trad Med* 16: 51-58.
40. James GL. 1995. *Methods in Immunotoxicology*. John Wiley-Liss, Inc, San Diego. Vol 2, p 15.
41. Song HJ, Shin MK. 1987. Effects of *Houttuynia herba* on immune responses and histological findings in mice bearing pneumonitis. *Kor J Pharmacogn* 18: 216-232.
42. Cho SH, Yang KM, Bae BS, Im SA, Yu RN. 1998. Effect of sea tangel intake on cytokine production in macrophage from normal and diabetic mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 952-959.
43. Kwon SH, Woo HJ, Han DS, Kim MK. 2001. Effect of dried powders and water extracts of *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, antioxidative capacity and immune status in rats. *Korean J Nutr* 34: 271-284.
44. Singh IP, Sarzotti M, Coppenhaver DH, Past J, Baron S. 1989. Postinfection therapy of arbovirus infections in mice. *Antimicrob Agents chemother* 33: 2126-2131.
45. Sarzotti M, Coppenhaver Dh, Singh IP, Past J, Baron S. 1989. The in vivo antiviral effect of CL246, 738 is mediated by the independent induction of interferon-alpha and interferon-beta. *J Interferon Res* 9: 265-272.
46. Sprenter H, Jacorbm C, Main M, Gresser AM, Prinz H, Wesemann W, Gemsa D. 1992. Enhanced release of cytokines, interleukin 2 receptors, and neopterin after long distance running. *Clin Immunol Immunopath* 63: 183-190.
47. Nathan CF. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3059.
48. Son EH, Park JH, Kim KR, Kim BO, Dong KR, Pyo SN. 1998. Effects of the administration of Bezoar bovis on immune responses of mice. *Kor J Pharmacogn* 29: 48-55.

(2004년 10월 26일 접수; 2005년 1월 25일 채택)