

어성초 ethanol 추출물의 마우스 살모넬라 감염증에 대한 항균 및 치료효과 규명

김동혁¹⁾ · 임정주¹⁾ · 이진주¹⁾ · 정원철¹⁾ · 신현진²⁾ · 이후장¹⁾ · 김곤섭¹⁾ · 김 석^{1,3)*}

¹⁾경상대학교 수의과대학, ²⁾충남대학교 수의과대학, ³⁾경상대학교 농업생명과학연구원
(2008년 6월 17일 접수, 2008년 6월 23일 수리)

Antibacterial and Therapeutic Effects of *Houttuynia cordata* Ethanol extract for Murine Salmonellosis

Dong Hyeok Kim¹⁾, Jung Ju Lim¹⁾, Jin Ju Lee¹⁾, Won Chul Jung¹⁾, Hyeon Jin Shin²⁾, Hu Jang Lee¹⁾, Gon Sup Kim¹⁾, and Suk Kim^{1,3)*} (¹⁾College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, ²⁾College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, ³⁾Institute of Agriculture and Life Science)

ABSTRACT: Salmonellosis is a major bacterial zoonosis that causes a variety of disease syndromes, self-limited enteritis to fatal infection in animals and food-borne infection and typhoid fever in humans. Recently, the emergence of multidrug resistant strains of *Salmonella* spp. causes more serious problems in environment and public health. The present study was investigated the antibacterial effect of *Houttuynia cordata* ethanol extract (HCEE) for murine salmonellosis. In the cytotoxic effect of HCEE on RAW 264.7 cells, there was no detectable effect with any concentrations between 25 and 100 $\mu\text{g/ml}$ after 8 h incubation. The bacteriocidal effect of HCEE was not showed on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*). HCEE makes morphological change of the RAW 264.7 cells, and there was significant decreased bacterial uptake and intracellular replication within *Salmonella* infected cells. And further nitric oxide (NO) production of *Salmonella* infected RAW 264.7 cells with HCEE was decreased comparing to RAW 264.7 cells without HCEE until 8 h post infection. Oral administration of HCEE showed a therapeutic effect for *S. typhimurium* infected BALB/c mice. The mortality of HCEE treated mouse was 80% until 12 days, while that of HCEE untreated mouse was 100 % until 8 days after lethal dose of *S. typhimurium* infection. These data suggested that HCEE has a potency treatment for intracellular replicative pathogen including salmonellosis, brucellosis, tuberculosis, listeriosis etc., and the application of HCEE makes new strategies for safety medicine development without antibiotic resistance bacterial appearance and residue problem in food and solves the public health problem from antibiotic mis- and over use.

Key Words: Salmonellosis, *Houttuynia cordata* ethanol extract, therapeutic effect, mouse

서 론

현재 국내외적으로 감염증 치료를 포함한 축수산업의 항생제 사용이 증가하고 있어, 인체에 여러가지 부작용을 초래할 수 있으며, 특히 항생제 오남용에 의한 항생제 내성균의 출현이 사회적 문제로 대두 되고 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하고자 많은 국가에서 항생물질 대체제의 개발에 박차를

가하고 있으며 천연소재 자원을 이용한 대체제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 어성초는 국내, 일본 및 중국 등과 같은 나라에서 오랜 기간 동안 소독제, 이노제, 해열제로 사용되었으며, 항균제, 항바이러스 제제, 항염증 제제로서 사용되어왔다¹⁻³⁾. 어성초는 methyl nonyl ketone, Caryophyllene, bornyl acetate, α -pinene, β -pinene, limonene 등의 화학물질을 포함하고 있다. 이들 화학물질들은 그람 양성 균인 *Staphylococcus aureus*와 *Sarcina ureae*에 대한 항균효과가 보고되었다⁴⁾. 또한, 어성초는 소염효과, 항균효과, 비만세포활성효과, 항과민효과, NO 생성 조절효과 등을 가지고 있다고 보고되었다⁵⁻⁸⁾.

*연락처:

Tel: +82-55-751-6631 Fax: +82-55-751-5803
E-mail: kimsuk@gnsu.ac.kr

세균에 의한 감염증은 크게 세균이 산생한 독소에 의한 발병과 세균 자체의 감염에 따른 숙주세포의 생리적 변화를 유발하여 발생하는 질병으로 크게 나눌 수 있다. 세균 자체의 감염에 따른 질병 중 살모넬라, 브루셀라, 결핵, 리스테리아 감염증과 같이 숙주세포 내 기생하면서 질병을 유발하는 감염증의 경우 치료가 상당히 어렵고, 숙주에 대한 상해작용 또한 상당히 높다. 그 이유는 숙주세포 내 증식하며 발병하기 때문에 일반적인 항생제치료가 용이하지 않을 뿐만 아니라 면역반응 또는 탐식세포에 의한 침입균 사멸기능 등 숙주 고유의 질병방어기전에 의한 질병제거가 용이하지 않기 때문이다.

포유동물에서 면역반응은 크게 선천면역과 후천면역으로 구분된다. 선천면역은 미생물의 감염 시 가장 먼저 일어나는 반응이다. 여기에는 상피 표면에서 분비되는 항균성 펩타이드와 탐식세포에 의한 미생물의 탐식 및 제거, 그에 따르는 보체반응 등으로 구성된다. 이외는 다르게 후천면역은 이미 감작되어진 특정 항원에 대한 반응으로 정의되어 진다⁹⁾. 선천면역에선 superoxide (O₂)와 같은 reactive oxygen intermediates(ROIs)와 Nitric oxide(NO)와 같은 reactive nitrogen intermediates(RNIs)가 세포 내 미생물을 죽이는데 중요한 역할을 수행한다¹⁰⁾.

살모넬라 감염증은 대표적인 인수공통전염병의 하나이며 동물에서 유산을 유발하며, 음식에 의해 감염되고 사람에서 장염 및 장티푸스를 유발하는 중요한 세균성 질병이다¹¹⁾. 살모넬라감염증의 원인체인 *Salmonella* spp.는 운동성이 있는 간균으로 그람 음성균이며 특히 탐식세포 및 비탐식세포 내에서 증식이 가능한 세균이기 때문에 치료가 상당히 어려운 대표적인 난치성 질병 중 하나이다.

최근 항생제등의 약물을 오남용함으로써 약물에 대한 저항성을 가진 *Salmonella* spp.가 나타나 공중보건학측면에서 심각한 문제를 야기하고 있다¹²⁾.

현재의 의료 및 축산정책 하에서는 *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *Listeria* spp., *Shigella* spp. 등과 같은 난치성 감염증을 해결하기 위해서는 보다 많은 항생제의 투여와 치료기간 그리고 많은 비용과 노력이 필요하게 될 것이며, 이로 인해 야기되는 문제는 더욱 심각해 질 전망이다, 대책 마련 또한 시급한 실정이다.

본 연구는 천연소재 약용자원인 어성초를 이용하여 대표적인 인수공통 전염병이자 세포내 기생 감염증의 하나인 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium에 대한 항균효과 및 치료효과를 in vitro와 in vivo상에서 실험을 수행하였고, 이를 토대로 어성초를 활용한 항생제 대체 물질 및 세포내 기생 세균성 감염증에 대한 안전한 치료제의 개발 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

Ethanol을 이용한 어성초(*Houttuynia cordata*) 추출

경상대학교 동물생리활성물질 자원은행에서 구입한 어성초 분말 5 g을 100 ml의 absolute ethanol을 이용하여 8시간

동안 실온에서 교반시켜 용해시켰다. 어성초 용액의 상등액을 10분 동안 5,000 rpm으로 원심분리 시킨 후, Advantec filter paper number 2(Japan)으로 여과시켰다. 여과시킨 용액을 54°C에서 수분을 증발시켜 분말을 얻었다. 어성초 분말은 증류수로 5 mg/ml의 농도로 녹인 후, Corning syringe filter(0.20 μm, Japan)를 이용하여 멸균시켰다⁷⁾.

균 배양 및 배지

glycerol stocks으로 -70°C에 보관되어있는 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium(*S. typhimurium*) ATCC 14028를 Luria-Bertani(LB) broth혹은 1.5% LB agar에서 배양시켰다. 균은 37°C에서 stationary phase가 되도록 교반 배양 하였다.

살균효과 검정

박테리아는 pH 7.4로 적정된 PBS를 이용하여, 2×10⁴/ml 이 되도록 희석하고 HCEE를 0, 25, 50, 100 μg/ml의 농도가 되게 균액과 섞어주었다. 이 용액을 37°C에서 0, 2, 4, 8 시간 동안 배양하였고, 배양 후 용액을 적절하게 희석하여 LB agar에서 spreading하여 bacterial colony forming unit(CFU)를 측정하였다

세포 배양

마우스 탐식세포인 RAW 264.7 세포를 5% CO₂, 37°C 환경에서 RPMI 1640 + 10% fetal bovine serum(Gibco) 배지를 이용하여 배양하였다. 탐식세포는 실험을 수행하기 하루 전에 96-well cell culture plate에 각 well마다 1×10⁴의 농도로 분주한 후, 5% CO₂, 37°C 환경에서 배양하였다.

탐식세포의 형태변화 관찰

24-well cell culture plate에 coverslips과 함께 배양한 탐식세포에 100 μg/ml이 되도록 HCEE를 넣은 후, 0, 2, 4, 8시간 동안 배양하였다. 현미경하(200×)에서 coverslip을 관찰하여, 탐식세포의 형태변화를 확인하였다. 100개의 탐식세포를 무작위적으로 선택하여, 형태변화가 일어난 세포의 수를 확인하였다.

세포독성 검사

HCEE가 탐식세포에 독성을 가지는지 알아보기 위해, 0, 25, 50, 100 μg/ml 농도의 HCEE와 탐식세포를 8시간 동안 96-well cell culture plate에서 배양하였다. 세포의 생존율은 MTT cleavage assay를 통하여 확인하였다.

탐식세포에 있어 세균의 침입 및 증식 양상 측정

탐식세포에 *S. typhimurium*을 감염시켜 균의 침입 및 증식 양상을 측정하였다¹³⁾. 균 감염 4시간 이전에 HCEE를 농도별로 주입하여 같이 배양하였다. 균의 침입 양상을 측정하기 위해, MOI 20(multiplex of infection)이 되게 감염시켜

37°C, 5% CO₂ 환경에서 30분 혹은 60분 동안 배양하였다. 배양 후 세포에 탐식되지 않은 세포 외부의 균을 죽이기 위하여 기존의 배지를 30 µg/ml의 gentamicin이 포함된 RPMI 1640 + 10% FBS 배지로 교체한 후, 30분 동안 더 배양하였다. 이후 감염된 세포는 PBS로 3회 washing한 후, DW를 이용하여 세포를 용해하여 세포 내 균을 LB agar에 spreading하여 균 수를 측정하였다. 세포 내 균의 증식은 균 감염(MOI 20)을 수행하여 1시간 동안 배양한 후 gentamicin을 포함한 RPMI 1640 + 10% FBS배지로 교체한 뒤, 2, 4, 8시간 동안 배양하였다. 세포 내 균 수의 측정은 균 침입 양상 측정법과 동일하게 수행하였다.

Nitric oxide(NO)농도 측정

탐식세포를 12-well cell culture plate(1×10⁵ cells/well)에 분주한 후, HCEE를 0, 25, 50 and 100 µg/ml의 농도가 되게 주입한 후, 4시간 동안 배양하였다. 이 후 세균을 MOI 20이 되게 감염한 후, 2, 4, 8시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 50 µl의 상등액을 채취하여 Griess reaction 방법으로 NO농도를 측정하였다. 50 µl의 상등액을 96-well plate에 옮긴 후, 동일한 양의 Griess reagent(Sigma)와 빛이 들어오지 않는 환경에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, Biotrak II Reader를 사용하여, 450 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. NO농도는 sodium nitrite를 기준으로 측정하였다.

Murine salmonellosis에 대한 HCEE의 치료효과

무균상태인 6-8주령, 몸무게 25±3 g의 암컷 BALB/C mice를 실험에 사용하였다. Mice의 사육환경은 12시간 마다 실내 조명을 명/암으로 조절하여 주었으며, 23±1°C의 온도를 유지하였다. 또한, 실험 2주전부터 물과 음식을 자유로이 섭취하게 하였다. 두 집단으로 구분한 mice에 복강내 주사를 통하여 치사량인 2×10⁴이 되게 희석한 *S. typhimurium*을 주입하였다. 이후 시험 그룹 별 0.1 ml의 PBS 혹은 HCEE (100 µg/ml)용액을 24시간 마다 경구를 통해 투약하였다. 감염된 mice의 생존률은 매 24시간마다 확인하였다. 모든 실험절차는 경상국립대학교의 동물윤리협회의 규정에 의거 실험을 수행하였다.

통계처리

모든 실험결과는 Student's *t*-test를 이용하여 통계처리를 수행하였다. 결과의 처리는 P<0.05를 유의성 있는 결과로 판정하였다.

결과 및 고찰

앞서 발표된 여러 논문들에서 어성초에 의한 다양한 세균에 대한 항균효과가 보고 되었다^{4,6)}. 그러나 현재까지의 보고는 비병원성 균 또는 독소산생 균에 대한 항균효과가 대부분

이었고, 세포내 기생세균에 대한 항균효과는 보고가 되어 있지 않다. 이에 따라 본 연구는 HCEE가 *S. typhimurium*에 대한 항균효과를 가지는 지에 대한 실험을 수행하였다. 균 수를 1×10⁴로 조절한 후, HCEE용액 0, 25, 50, 100 µg/ml과 섞어서 37°C에서 0, 2, 4, 8시간 동안 배양하였다. 하지만 HCEE에 의한 살균효과를 검증한 결과, HCEE에 의한 *S. typhimurium*에 의한 직접적인 살균효과는 보이지 않았다 (Fig. 1). 이에 따라 HCEE가 탐식세포를 활성화시켜 간접적으로 *S. typhimurium*에 대한 항균효과를 가지는지 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 HCEE가 0, 25, 50, 100 µg/ml의 농도가 되도록 처리하였다. 우선, HCEE가 RAW 264.7 세포를 활성화시키는지 알아보기 위하여 세포의 형태변화를 관찰하기 위해 탐식세포에 HCEE용액 100 µg/ml을 넣은 후, 4, 8시간 동안 배양한 후 세포의 형태를 현미경하에서 관찰하였고, 그 결과 배양시간이 경과함에 따라 탐식세포의 형태적 변화가 증가 되었으며, 처리 후 8시간에 이르러 비 처리군의 형태적 변화가 5±3%인데 비하여 처리군의 형태적 변화는 52±9%에 이르렀다(Fig. 2A, B). 또한 MTT test를 수행하여 HCEE에 의한 세포 독성 유무를 관찰해본 결과 HCEE에 의한 세포독성은 100 µg/ml의 농도에서는 나타나지 않았다. 탐식세포의 형태변화와 세균에 대한 탐식능 및 탐식세포 내 증식능과의 관계를 규명하기 위하여 HCEE처리 탐식세포에 대한 균 감염을 수행하였다. 탐식능의 경우, 0, 25, 50, 100 µg/ml의 HCEE가 포함된 배지 안에서 탐식세포와 세균을 30분 혹은 60분간 반응시켜 각각의 시간 동안 탐식세

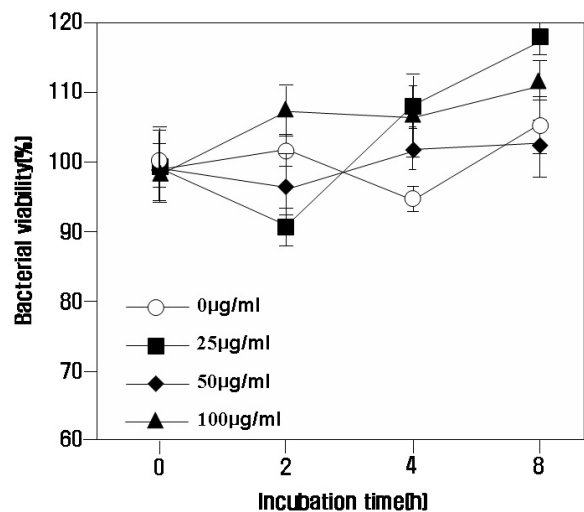


Fig. 1. The antibacterial activities of HCEE against *S. typhimurium*. Various concentrations of HCEE diluted with distilled water were incubated with *S. typhimurium* for 2, 4 and 8 h. The bacterial viability was measured by CFU on plate spreading and the rate of bacterial viability was compared to HCEE untreated PBS as a control. The data represent the mean ± S.D. of triplicate experiments.

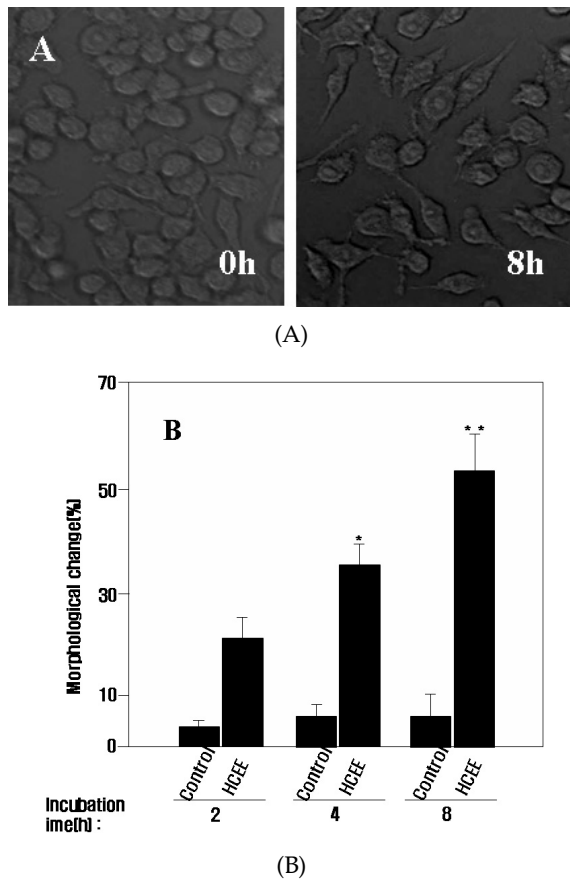


Fig. 2. Effects of HCEE on the morphological changes of macrophages. Murine macrophage cell line RAW 264.7 cells were cultured in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ HCEE for 0, 2, 4 and 8 h. (A) After 0 and 8 h incubation, the morphological changes were photographed at 200 \times magnification. (B) One hundred RAW 264.7 cells were examined per coverslip, and the rates of morphologically changed cells such as dendritic forms were measured. Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and error bars represent the standard deviations. Statistically significant differences between morphologically changed cell number of HCEE untreated macrophage and that of HCEE treated macrophages are indicated by asterisks (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$).

포가 세균을 탐식하는 양과 세균에 의한 침입되는 양을 측정하였고, 탐식세포 내 탐식된 세균의 증식 정도를 확인하기 위해 0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 HCEE가 포함된 배지 안에서 동일한 양의 세균을 탐식세포에 감염시킨 후, 2, 4, 8시간 동안 배양을 통하여 세포내의 세균의 증식 정도를 확인하였다. 탐식세포에 대한 *S. typhimurium* 탐식 정도를 측정할 결과, 30분까지는 HCEE처리군에서 *S. typhimurium*의 침입이 HCEE비처리 대조군에 비해 탐식이 더 많이 일어나는 양상을 보였으나, 60분에서는 *S. typhimurium*의 탐식이 HCEE의 용량이 증가함에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다

(Fig. 3A). HCEE 처리에 의한 탐식세포 내에서 *S. typhimurium*의 증식 정도를 확인 해 본 결과 HCEE의 농도에 비례하여 탐식세포내 균의 증식이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B).

RNIs는 *Salmonella*의 탐식세포 내 증식에 관여하며^{14,15} 또한, apoptosis에 관여한다고 보고되어 있다¹⁶). 이에 탐식세포 내 *S. typhimurium*의 증식이 억제되는 기전을 조사하기 위해, HCEE를 첨가하였을 때 세포의 NO 산생량의 변화를 측정하였다. 이를 위해 0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 HCEE를 4시간 동안 탐식세포와 배양한 후, *S. typhimurium*을 MOI 20으로 감염시켰다. 2, 4, 8시간 뒤에 배지의 상층액과 Griess용액을 반응시킨 후 NO값을 측정해 본 결과, 균을 감염시킨 실험군이 균을 감염시키지 않은 대조군에 비하여 NO 산생량이 크게 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 균을 감염시킨 실험군 중에서 8시간째에 HCEE를 처리한 군이 HCEE를 처리하지 않은 군에 비해 NO산생량이 감소하는 양상을 보이고는 있으나, 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4). 지금까지의 결과에서 HCEE는 *S. typhimurium*에 대해 직접적으로 정균 및 살균 효과를 보이지 않았으나, 탐식세포에서 *S. typhimurium*에 의한 침입 및 증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이에 in vivo실험을 통하여 과연 HCEE가 *S. typhimurium* 감염된 마우스에 치료효과 여부를 검정해보았다. 두 그룹의 mice에 복강내주사를 통해 치사량인 2×10^4 의 *S. typhimurium*을 감염시켰다. 이후, 실험군에는 100 $\mu\text{g/ml}$ HCEE를 0.1 ml을 24시간마다 경구를 통해 투여하고, 같은 방식으로 대조군에는 PBS 0.1 ml을 주입하였다. 이 결과 HCEE를 투여한 실험군에서 실험 12일 동안 80%가 생존하였지만, PBS를 투여한 대조군에선 8일까지 모든 mice가 사망하였다(Fig. 5). 이를 통해 HCEE가 murine salmonellosis에 대하여 치료 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

본 실험 결과를 통해 HCEE가 탐식세포의 *S. typhimurium*의 침입 억제효과를 통해 유추해 볼 때, *S. typhimurium*의 주 기생세포인 장 탐식세포의 하나인 상피세포에서의 *S. typhimurium* 침입억제가 유도 되어지고, 감염의 정도가 약하게 일어날 것이라 예측할 수 있다. 또한, HCEE가 탐식세포 내 *S. typhimurium*의 증식이 억제됨으로서 균체의 사멸을 포함한 신체 전체적인 방어기전을 통한 치료 효과임을 짐작할 수 있다. 또한 mouse 감염실험에서 유효한 치료효과가 입증되었던 바, 감염증에 대한 HCEE의 치료효과는 HCEE가 가지고 있는 고유한 항염증 효과로 인하여 살모넬라증의 병원성 발현에 필요한 염증을 억제시켜 치사율이 낮아지고 생체적 방어기전을 통한 치료효과가 나타나는 것으로 추정된다¹⁻³).

어성초는 그 시료와 정제법에 따라 다르지만 methyl nonyl ketone, bornyl acetate, β -myrcene, α -pinene, β -pinene, acetic acid geraniol ester, camphene, sabinene, *n*-decanal contents, caryophyllene, limonene, 4-terpineol, α -terpineol and acetic acid geraniol ester등이 주요성분임이 밝혀졌

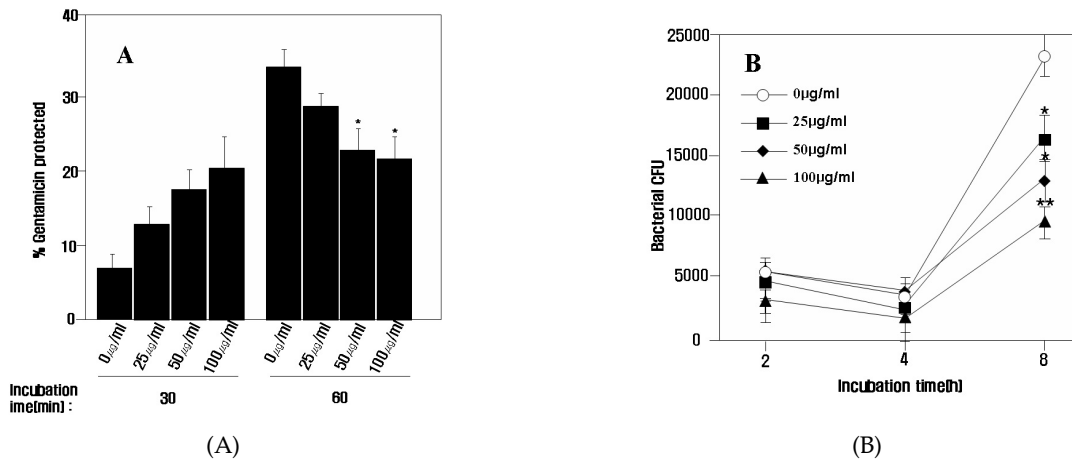


Fig. 3. Bacterial uptake and intracellular replication of *S. typhimurium* within HCEE treated macrophages. Murine macrophage cell line RAW 264.7 cells were incubated with different concentrations of HCEE (0, 25, 50 and 100 µg/ml) for 4 h before bacterial infection, and then *S. typhimurium* were deposited onto RAW cells, incubated at 37°C for the periods of time indicated. (A) Bacterial internalization efficiency by macrophages was determined by evaluating the protection of internalized bacterial from gentamicin killing and quantitated as described previously (see Materials and Methods). Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and error bars represent the standard deviations. Statistically significant differences between bacterial internalization of HCEE untreated macrophage and that of HCEE treated macrophages are indicated by an asterisk. (B) At different times of incubation, the cells were lysed, and the numbers of viable intracellular bacteria were determined. Datum points and error bars represent the mean CFU of triplicate samples from a typical experiment (performed at least three times) and their standard deviations. Statistically significant differences between viable intracellular bacteria of HCEE untreated macrophage and that of HCEE treated macrophages are indicated by an asterisk (*, P<0.01).

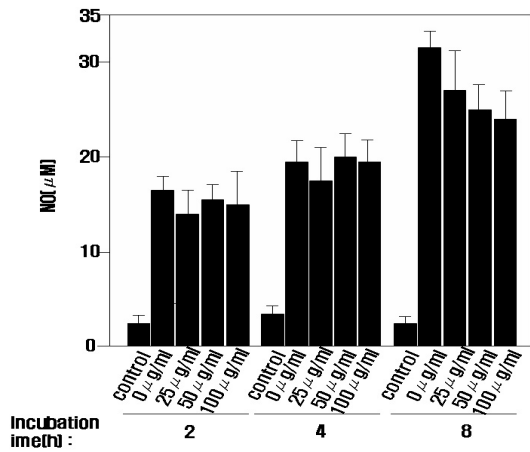


Fig. 4. Effects of HCEE on the production of nitric oxide (NO) from macrophages. RAW 264.7 cells were pre-incubated in the presence of different concentrations of HCEE (0, 25, 50 and 100 µg/ml) for 4 h. After incubation, medium was changed, and *S. typhimurium* (MOI 20) were infected onto RAW cells. After indicated time points, cell-free supernatant were collected, and nitrite concentration was determined. Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and error bars represent the standard deviations. Statistically significant differences between NO production of HCEE untreated macrophage with bacterial infection and that of HCEE treated macrophages are indicated by an asterisk (*, P<0.01).

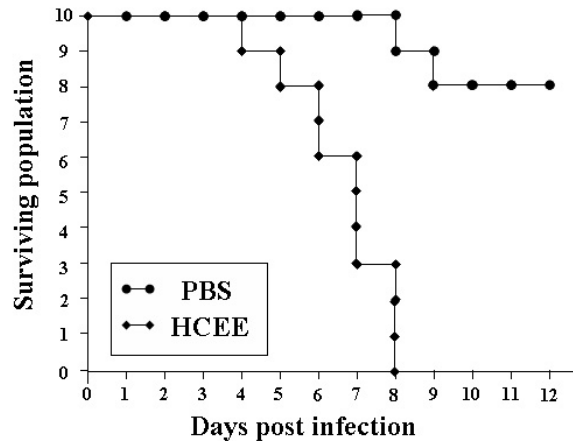


Fig. 5. Therapeutic effects of HCEE-treated mice with bacterial infection. Mice (n=10, per group) treated (circle) or untreated (square) with HCEE, were infected with *S. typhimurium*. Mortality was observed daily for 12 days postinfection.

으며, 이들 성분에 의한 항균효과가 보고 되어 지고 있다⁴⁾. 일 예로, methyl nonyl ketone는 *E. coli*에 대한 증균 효과를 가지며, β-myrcene는 항세균 효과, caryophyllene, bornyl acetate, α-pinene, β-pinene and limonene는 살균 효과 및 항진균 효과를 나타낸다고 보고되었다¹⁶⁻¹⁸⁾. *S. typhimurium*은 공중보건학적인 측면에서 많은 문제를 유발하므로 많은 연구자들이 살모넬라증의 예방과 치료에 대해 많은 연구를 수행

하였으나 아직까지 질병에 대한 특효약이나 백신이 개발되지 않은 상황이다.

*S. typhimurium*은 탐식세포내에서 탐식세포의 식작용을 억제시켜서 포식세포내에서 증식하고¹⁹⁾, *S. typhimurium*은 체내에서 면역억압과 염증을 유발하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 세포 내 기생 세균 감염증에 있어서 숙주세포의 Nitric oxide (NO)와 같은 reactive nitrogen intermediates(RNIs)의 증가는 세포 내 미생물을 죽이는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다⁴⁰⁾. 또한 산생된 NO는 apoptosis를 유도하는 것으로 보고되고 있다²¹⁾. 살모넬라 감염증에 대한 숙주세포의 방어기전은 탐식된 숙주세포에서 NO 및 O₂ 산생에 의한 균 사멸, 탐식세포 내 lysosome과의 융합에 의한 균 사멸, 숙주세포의 apoptosis에 의한 균 사멸 등이 보고되고 있다²²⁻²⁶⁾. 앞서 설명한 바와 마찬가지로 탐식된 세포 내 균의 사멸에 관여하는 숙주세포의 공격인자는 NO 산생 또는 lysosome에 의한 공격을 예로 들 수 있는데 본 실험에서 수행한 균 감염 후 탐식세포의 NO 산생 능력은 HCEE처리 군에 있어서 NO의 산생이 비처리 대조군에 비해 저하됨이 확인되었던 바, 이는 탐식능 및 세포내 증식능의 저하에 따른 숙주세포의 반응에 의함을 추정할 수 있다. 따라서 HCEE처리 탐식세포의 균 사멸 효과는 O₂ 산생, lysosome의 활성화에 따른 균 사멸, 숙주세포의 apoptosis 유도에 의한 균 사멸 등을 고려할 수 있겠으나, 이에 대한 해석을 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 실험을 통해서 천연소재 약용자원인 HCEE의 추출물이 난치성 인수공통 전염병의 대표적인 살모넬라증에 대하여 유효한 치료효과가 있음이 동물 실험을 통해 확인 되었으며, 이는 여성초 추출물 자체로서의 제품 개발과 추출물에 대한 성분 분석을 통한 신약개발이 가능할 것이며 전세계적으로 문제가 되고 있는 항생제 오남용 및 잔류 문제를 줄이는데 도움이 될 것이다.

요 약

항생제의 오남용으로 인한 항생제 내성을 가진 세균의 출현은 공중보건학적인 측면에서 많은 피해를 입히고 있다. 또한, 세포 내 기생세균의 경우 예방과 치료가 어려운 상황에 놓여져 있고 항생제 대체 물질개발에 많은 관심이 집중되고 있다. 여성초는 오랜 기간 동안 소독제, 이노제, 해열제, 항균제, 항바이러스 제제, 항염증 제제로서 사용되어왔으며 중요한 민간요법의 하나로서 인식되고 있는 바, 본 실험에서는 여성초의 ethanol 추출물이 세포내 기생 난치성 세균 감염증인 *S. typhimurium*의 감염증에 대한 치료효과를 검증하였다. 본 실험의 결과로서 HCEE 추출물이 탐식세포의 형태적 변화를 유도하였고, *S. typhimurium*에 대한 직접적인 살균작용과 탐식세포를 통한 항균작용은 미약한 것으로 나타났다. 또한 HCEE 추출물이 *S. typhimurium*의 탐식세포 감염 시간경과에 따라 감염능 및 세포내 증식능이 감소하는 것이

확인되었다. 탐식균에 의한 사멸을 유도하는 탐식세포의 NO의 산생량에 있어서는 HCEE 추출물의 처리가 탐식세포로부터 NO 산생이 감소되어 NO를 이용한 탐식세포의 균 사멸과는 직접적 연관이 없을 것으로 추정되며, 마우스 감염시험에서 HCEE를 투약이 상당한 치료효과를 나타내어 HCEE가 *S. typhimurium*에 의한 염증을 감소시키고, 또한 apoptosis를 유도함으로써 균을 제거함으로써 이루어지는 것으로 추측된다. 본 연구를 통해 HCEE의 살모넬라증에 대한 치료효과를 확인 할 수 있었으며, 천연소재 약용자원을 활용한 난치성 세균 감염증에 대한 신약개발이 가능하고, 이의 활용은 항생제 오남용을 줄일 수 있고 국민보건 증진에 이바지 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부의 지원에 의해 연구가 수행됨(No. 70000147).

참고문헌

1. Tang, B. X., Duan, L. D., Wang, Y., Zhao, L. Z., Yu, Y. G. and Li, X. S. J. (2005) Shaoyang University (Natural Sciences) 2 (87), 80-81.
2. Zheng, Z. H., Dong, Z. H. and She, J. (1998) "Modern Research and Application of Traditional Chinese Medicines." Vol. 3. Xueyuan Press. Beijing. pp. 2983-3003.
3. Lu, H. M., Liang, Y. Z., Yi, L. Z. and Wu, X. J. (2006) Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. J. Ethnopharmacol. 104, 245-249.
4. Lu, H., W, X., Liang, Y. and Zhang, J. (2006) Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia* THUNB. Chem. Pharm. Bull. 54(7), 936-40.
5. Iqbal, M., Ohen, R. I, Marzouk, K. and Liu, S. F., (2002) Time course of nitric oxide, peroxynitrite, and antioxidants in the endotoxemic heart. Crit. Care. Med. 30, 1291-1296.
6. Berendji, D., Kolb-Bachofen, V., Meyer, K. L. and Kroncke, K.D., (1999) Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide-mediated stress. Free Radic. Biol. Med. 27, 773-780.
7. Park, E., Kum, S., Wang, C., Park, S. Y., Kim, B. S. and Schuller-Levis, G. (2005) Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor-alpha

- secretion in an activated macrophage-like cell line. *Am. J. Chin. Med.* 33(3), 415-424.
8. Li, G. Z., Chai, O.H., Lee, M.S., Han, E.H., Kim H.T. and Song C.H. (2005) Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biol. Pharm. Bull.* 28(10), 1864-1868.
 9. Cherayil, B. J. and Antos, D. (2001) Inducible nitric oxide synthase and *Salmonella* infection. *Microbes. Infect.* 3, 771-776.
 10. Nathan, C. and Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8841-8848.
 11. Valle, E. and Guiney, D.G. (2005) Characterization of *Salmonella*-induced cell death in human macrophage-like THP-1 cells. *Infect. Immun.* 73, 2835-2840.
 12. Miriagou, V., Carattoli A. and Fanning S. (2006) Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes. Infect.* 8(7), 1923-30.
 13. MacFarlane, A. S., Schwacha, M. G. and Eisenstein T. K. (1999) In vivo blockage of nitric oxide with aminoguanidine inhibits immunosuppression induced by an attenuated strain of *Salmonella typhimurium*, potentiates *Salmonella* infection, and inhibits macrophage and polymorphonuclear leukocyte influx into the spleen. *Infect. Immun.* 67, 891-898.
 14. Umezawa, K., Akaike, T., Fujii, S., Suga, M., Setoguchi, K., Ozawa, A. and Maeda, H. (1997) Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect. Immun.* 65, 2932-2940.
 15. Kim, S., Watarai, M., Kondo Y., Erdenebaatar, J., Makino S. and Shirahata T. (2003) Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect. Immun.* 3020-3027.
 16. Margaret, W., Nilofer, Q., Nancy, S. and Gary, S. (2001) High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages. *Microbial Pathogenesis* 31,221-230.
 17. Oumzil, H., Ghouami, S., Rhajaoui, M., Ildrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Faïd, M. and Benjouad A. (2002) Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res.* 16, 727-731.
 18. Martins, A. P., Salgueiro, L. R., Goncalves, M. J., Vila, R., Tomi, F., Adzet, T. and Casanova J. (2000) Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*, an endemic species from S. Tomé e Príncipe. *Planta Med.* 66, 647-650.
 19. Foster, J. W. and Spector M. P. (1995) How *Salmonella* survive against the odds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 145-174.
 20. Lu, S., Manges, A. R., Xu, Y., Fang, F. C. and Riley L. W. (1999) Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella enteritidis* in vivo and in vitro. *Infect. Immun.* 67, 5651-5657.
 21. Kwon, K. B., Kim, E. K., Shin, B. C., Seo, E. A., Yang, J. Y. and Ryu, D. G., (2003) *Herba houttuyniae* extract induces apoptotic death of human promyelocytic leukemia cells via caspase activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Exp. Mol. Med.* 35, 91-97.
 22. Guiney, D. G. (2005) The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2005; 289, 131-50.
 23. Chakravorty, D. and Hensel, M. (2003) Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes. Infect.* 5, 621-627.
 24. Macmicking, J. D., Xie, Q. W. and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-350.
 25. Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumgard, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. and Nathan, C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256, 225-228.
 26. Garcí-a-del Portillo, F. (1996) Interaction of *Salmonella* with lysosomes of eukaryotic cells. *Microbiologia.* 12(2), 259-66.