

바실러스균 발효황금약침액이 Lipopolysaccharide로 활성화된 마우스 대식세포의 인터루킨 생성에 미치는 영향

박완수

경원대학교 한의과대학 병리학교실

The Effect of Bacillus-Fermented Scutellariae Radix Acupuncture Solution on Interleukin Production in Mouse Macrophage Stimulated by Lipopolysaccharide

Wan-Su Park

Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Abstract

Objectives : The purpose of this study is to investigate the effect of Bacillus-fermented Scutellariae Radix acupuncture solution (SB) on interleukin(IL) production in mouse macrophage stimulated by lipopolysaccharide(LPS).

Methods : Productions of interleukins were measured by High-throughput Multiplex Bead based Assay with Bio-plex Suspension Array System based on xMAP[®](multi-analyte profiling beads) technology. To begin with, cell culture supernatant was obtained after treatment with LPS(1 μ g/mL) and SB for 24 hour. Then, it was incubated with the antibody-conjugated beads for 30 minutes. And detection antibody was added and incubated for 30 minutes. After incubating for 30 minutes, Streptavidin-conjugated Phycoerythrin(SAPE) was then added. Incubating for another 30 minutes, the level of SAPE fluorescence was analyzed on Bio-plex Suspension Array System.

Results : The results of the experiment are as follows. SB significantly inhibited the LPS-induced production of IL-3 (9.15 ± 0.35 pg/mL) by 6.92 ± 0.05 , 7.21 ± 0.11 , 6.96 ± 0.33 , and 7.45 ± 0.74 pg/mL at the concentration of 25, 50, 100, and 200 μ g/mL in mouse macrophage RAW 264.7 cells ($p < 0.05$). SB significantly inhibited the LPS-induced production of IL-5 (7.30 ± 0.48 pg/mL) by 6.50 ± 0.29 , 6.30 ± 0.25 , 6.30 ± 0.25 , and 5.80 ± 0.25 pg/mL at the concentration of 25, 50, 100, and 200 μ g/mL in RAW 264.7 cells ($p < 0.05$). SB significantly inhibited the LPS-induced production of IL-9 (17.26 ± 0.19 pg/mL) by 15.01 ± 0.43 pg/mL at the concentration of 25 μ g/mL in RAW 264.7 cells ($p < 0.05$). SB significantly inhibited the LPS-induced production of IL-13 (187.80 ± 2.90 pg/mL) by 152.80 ± 4.25 , 172.80 ± 3.97 , 162.10 ± 6.67 , and 165.30 ± 11.80 pg/mL at the concentration of 25, 50, 100, and 200 μ g/mL in RAW 264.7 cells ($p < 0.05$). SB significantly inhibited the LPS-induced production of IL-17 (18.30 ± 0.95 pg/mL) by 13.30 ± 1.25 , 13.80 ± 1.11 , 13.30 ± 0.75 , and 14.00 ± 1.08 pg/mL at the concentration of 25, 50, 100, and 200 μ g/mL in RAW 264.7 cells ($p < 0.05$). SB significantly inhibited the LPS-induced production of IL-23 (43.90 ± 0.83 pg/mL) by 39.50 ± 1.26 , 38.00 ± 1.78 , and 39.60 ± 2.49 pg/mL at the concentration of 25, 100, and 200 μ g/mL in RAW 264.7 cells ($p < 0.05$).

Conclusions : These results suggest that SB has anti-inflammatory activity related with its inhibition of IL-3, IL-5, IL-13, IL-17, and IL-23 production in macrophages.

Key words : Bacillus, Fermentation, *Scutellaria baicalensis*, Macrophage, Interleukin

1. 서론

- 교신저자: 박완수, 경기도 성남시 수정구 복정동
경원대학교 한의과대학 병리학교실,
Tel. 031-750-8821, E-mail: hang198@naver.com
- 본 연구는 2010년도 경원대학교 연구비지원에 의하여 수행된 연구
결과입니다.
- 투고 : 2010/05/22 심사 : 2010/06/08 채택 : 2010/06/10

인체는 끊임없이 외부로부터 침입하는 질병
발생체(pathogen)로부터 자신을 보호해야만

생존을 유지할 수 있다. 이와같이 외부로부터 침입하는 다양한 형태의 병원체들로부터 자신을 보호하는 생체방어기능을 ‘면역체계 (immune system)’라 한다. 염증반응(inflammatory reaction)도 면역활동의 하나로 열감, 종창, 홍적색, 통증, 그리고 기능이상을 수반한다. 즉 우리 몸은 외부 침입체를 제거하는 과정에서 ‘염증반응’을 일으키는 것이다. 염증반응은 인체방어작용의 필수과정이지만 제어되지 않을 때에는 급만성의 염증질환(acute & chronic inflammatory diseases)을 유발하는 등 오히려 해로운 상황을 유발하기도 한다. 그러므로 염증반응의 조절이 중요하다. 면역염증반응에는 다양한 면역염증세포들(immuno-inflammatory cells)이 관여되는 데, 특히 대식세포(macrophage)는 병원체 침입의 초기 단계에 침입한 항원을 ‘침입자’로 인식하고 인체 내의 다른 면역세포들에 적극적인 반응신호전달을 통하여 인체면역기능이 활성화되도록 한다¹⁻⁶⁾. 대식세포의 이러한 병원체성 항원(pathogenic antigen)인식은 싸이토카인(cytokine)의 한 종류인 인터루킨(interleukin) 생성증가로 이루어지며 생성이 증폭된 각종의 인터루킨에 의해서 다음 단계의 면역염증반응이 순차적으로 강화되며 진행된다. 외부로부터 침입한 병원체에 의해 자극받은 대식세포의 인터루킨 증가는 침입한 병원체들을 제거하기 위한 필수적인 조건이지만, 그러나 인터루킨의 생성이 지나치게 과잉되거나, 혹은 적절히 조율되지 않는다면 다양한 염증질환이 유발될 수 있다⁷⁻¹³⁾. 이러한 인터루킨의 특성에 근거하여, 외부물질에 자극받은 대식세포의 인터루킨 과잉생성을 조절할

수 있는 물질은 항염효과를 가지고 있는 것으로 여겨진다.

황금(黃芩; root of *Scutellaria baicalensis* Georgi)은 쓴 맛(味苦)을 가지고 있고 청열해독약(淸熱燥濕藥)으로 분류되며 태음폐열(太陰肺熱)을 가라앉히고 지혈(止血), 안태(安胎)의 효능이 있는 것으로 알려져 있으며¹⁴⁻¹⁵⁾, Yoon 등¹⁶⁾은 최근의 연구에서 황금(黃芩)의 항염효능에 대하여 보고한 바 있다.

최근 한약의 제형다양화 및 유효성증대와 관련하여 발효한약에 대한 관심이 증가되고 있다. 한국발효음식 중 대표적인 것이 청국장이며 이 청국장에서 발견되는 유익한 발효균이 바실러스균이다. 아직까지 바실러스균으로 발효시킨 황금약침액의 약리적 효능에 대한 보고가 많이 이루어지지 않고 있다.

이에 저자는 바실러스균(Bacillus)으로 발효시킨 발효황금약침액(SB)이 그람네거티브(gram negative) 세균으로부터 유래된 염증촉발내독소(endotoxin)인 지질다당체(lipopolysaccharide; LPS)로 자극된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 인터루킨 생성증가에 미치는 영향에 대해서 알아보기 위하여 *in vitro* 실험을 수행하고 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 phosphate buffered saline solution(PBS), lipopolysaccharide(LPS),

바실러스균 발효황금약침액이 Lipopolysaccharide로 활성화된 마우스 대식세포의 인터루킨 생성에 미치는 영향

그리고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 등은 Sigma 사(MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, interleukin 분석을 위한 multiplex cytokine assay kit는 Panomics사(CA, USA)와 Bio-rad 사(CA, USA)의 제품을 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였으며 본 실험에 사용된 기기는 Bio-plex 200(Bio-Rad, USA), air compressor (Tamiya, Japan), CO₂ incubator (NUAIRE, USA), clean bench(Jeio thec, Korea), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), homogenizer (Omni, USA), research microscope(Becton dickinson, USA), centrifuge(Hanil, Korea), fume hood(Hanil), ultrasonic cleaner(Branson, USA), microplate reader(Bio-Rad), thermo aluminum bath(Fine PCR, USA), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(iNtRON biotech., Korea), ice-maker (Vision Scientific Co), freeze dryer(Eyela), deep freezer(Revco, USA) 등이다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재 황금(黃芩; root of *Scutellaria baicalensis*)은 한국의 옴니허브주식회사(대구)에서 구입한 후 검정하였으며 검정된 약재(No. 200905-11)들은 경원대학교 한의과대학 병리학교실에 보관되었다.

2. 방법

1) 시료의 제조

바실러스균 발효황금약침액(SB)의 제조

는 이미 보고된 선행연구¹⁷⁾의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다.

(1) 황금 물추출물 제조

황금 60 g을 전기약탕기에 1차 증류수 1,000 mL와 함께 넣은 뒤 150분 동안 가열, 추출하였다. 추출이 끝난 뒤 추출액을 filter paper(Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 뒤, 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 뒤 발효할 시료로 사용하였다.

(2) 바실러스균 발효황금약침액(SB) 제조

위에서 제조된 황금 물추출물을 이용하여 다음과 같이 바실러스균 발효황금약침액(SB)을 제조하였다.

① 열수추출하여 건조한 황금 물추출물(3.0 g)을 screw cap tube 0.95 g을 담고 미리 추출된 조효소액을 2.2 mL을 첨가하여 37°C에서 2시간 효소 반응하였다.

② 바실러스속에 속하는 바실러스균(BM)을 황금 물추출물에 4%씩 접종하여 37°C에서 4일간 배양하였다.

③ 배양이 끝난 후 60°C에서 20분간 열처리하고 동결건조한 뒤, 1X PBS에 농도별로 용해하여 바실러스균 발효황금약침액(SB) 제조를 완료, 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 mouse macrophage (RAW 264.7 cell line)이며, 한국세포주은행

(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 세포 배양

세포의 배양이 이미 보고된 선행연구¹⁶⁾의 방법에 따라 다음과 같이 시행되었다. RAW 264.7 cells은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. RAW 264.7 cells은 75cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(Sigma, USA) 용액으로 씻어 준 후, 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하고 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음, 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 배양된 세포의 생존율에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위해서 MTT assay를 실시하였다.

4) 면역단백 다중분석법(multiplex cytokine assay)

LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells의 각종 interleukin 생성과 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Yoon 등¹⁶⁾의 방법을 참고하여 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100µL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배

양한 후, 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. LPS(1 µg/mL) 단독 혹은 배지에 녹인 시료(25, 50, 100, 200 µg/mL)와 함께 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상층액을 채취하여 다음의 멀티플렉스 어세이를 실시한다. 세포배양 상층액을 분주하기 전에 96 well plate 타입의 Filter plate를 wash buffer로 세척 후, 특정항체가 결합되어 있는 beads를 분주 후 다시한번 wash buffer로 세척한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 준비된 세포배양상층액과 표준물질 (standard antibody)을 각 well에 50 uL씩 분주한다. 분주가 끝나면 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 혼합된 Detection Antibody를 각 well에 25 uL씩 분주하고 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 잘 섞인 Streptavidin-PE를 각 well에 50uL씩 분주하고 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 각 well에 Reading buffer를 120uL씩 분주하고 실온에서 5분간 500rpm의 속도로 shaking한 후 Bioplex-200을 이용, 각 target 물질들의 발현량을 측정, 비교한다.

3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준오차 (Mean ± SEM)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 Student *t*-test와 Moses extreme reactions test로 분석하여 P<0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. SB가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-3 생성증가에 미치는 영향

MTT assay를 통하여 SB가 200 µg/mL의 농도까지 RAW 264.7 cells의 세포생존율을 감소시키지 않음을 확인한 뒤에 다음 실험을 진행하였다. LPS(1 µg/mL)와 함께 SB(0, 25, 50, 100, 200 µg/mL)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-3의 생성증가(9.15 ± 0.35 pg/mL)를 SB가 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 각각 6.92 ± 0.05, 7.21 ± 0.11, 6.96 ± 0.33, 7.45 ± 0.74 pg/mL로 유의(P<0.05)하게 감소시켰다(Fig. 1).

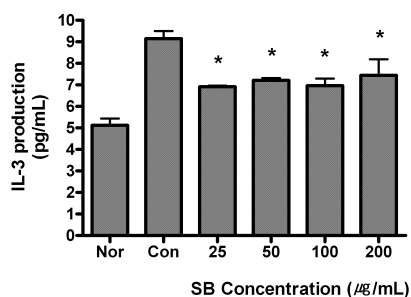


Fig. 1. Effect of SB on production of IL-3 in

RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay.

Cells were incubated with LPS (1 µg/mL) and SB (0, 25, 50, 100, 200 µg/mL) for 24 h. Results are represented as mean ± SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. * represents p < 0.05 compared to the control.

2. SB가 LPS로 유발된 RAW 264.7의 IL-5 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 µg/mL)와 함께 SB(0, 25, 50, 100, 200 µg/mL)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-5의 생성증가(7.30 ± 0.48 pg/mL)를 SB가 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 각각 6.50 ± 0.29, 6.30 ± 0.25, 6.30 ± 0.25, 5.80 ± 0.25 pg/mL로 유의(P<0.05)하게 감소시켰다(Fig. 2).

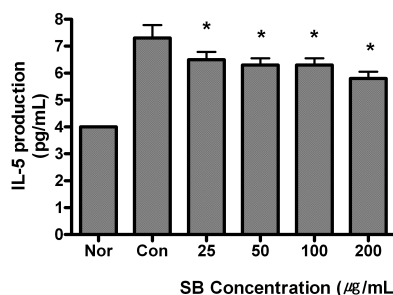


Fig. 2. Effect of SB on production of IL-5 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay.

Cells were incubated with LPS (1 µg/mL) and SB (0, 25, 50, 100, 200 µg/mL) for 24 h. Results are represented as mean ± SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. * represents p < 0.05 compared to the control.

3. SB가 LPS로 유발된 RAW 264.7의 IL-9 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 µg/mL)와 함께 SB(0, 25, 50, 100,

200 $\mu\text{g/mL}$)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-9의 생성증가($17.26 \pm 0.19 \text{ pg/mL}$)를 SB가 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서만 $15.01 \pm 0.43 \text{ pg/mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 3).

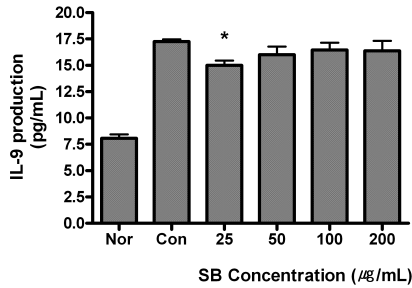


Fig. 3. Effect of SB on production of IL-9 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay.

Cells were incubated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) and SB (0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. Results are represented as mean \pm SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. * represents $p < 0.05$ compared to the control.

4. SB가 LPS로 유발된 RAW 264.7의 IL-13 생성증가에 미치는 영향

LPS($1 \mu\text{g/mL}$)와 함께 SB(0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-13의 생성증가($187.80 \pm 2.90 \text{ pg/mL}$)를 SB가 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 152.80 ± 4.25 , 172.80 ± 3.97 , 162.10 ± 6.67 , $165.30 \pm 11.80 \text{ pg/mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 4).

5. SB가 LPS로 유발된 RAW 264.7의 IL-17 생성증가에 미치는 영향

LPS($1 \mu\text{g/mL}$)와 함께 SB(0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-17의 생성증가($18.30 \pm 0.95 \text{ pg/mL}$)를 SB가 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 13.30 ± 1.25 , 13.80 ± 1.11 , 13.30 ± 0.75 , $14.00 \pm 1.08 \text{ pg/mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 5).

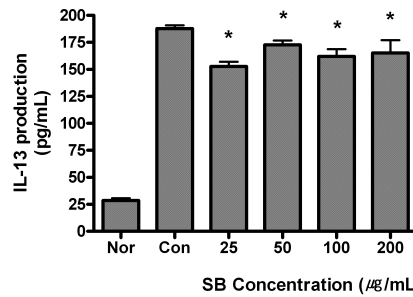


Fig. 4. Effect of SB on production of IL-13 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay.

Cells were incubated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) and SB (0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. Results are represented as mean \pm SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. * represents $p < 0.05$ compared to the control.

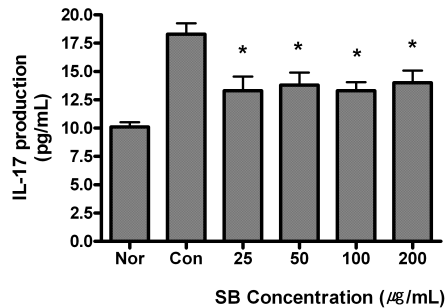


Fig. 5. Effect of SB on production of IL-17 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay.

Cells were incubated with LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) and SB (0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. Results are represented as mean \pm SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. * represents $p < 0.05$ compared to the control.

6. SB가 LPS로 유발된 RAW 264.7의 IL-23 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 SB(0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-23의 생성증가($43.90 \pm 0.83 \text{ pg}/\text{mL}$)에 대해서는 SB가 25, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서만 각각 39.50 ± 1.26 , 38.00 ± 1.78 , $39.60 \pm 2.49 \text{ pg}/\text{mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 6).

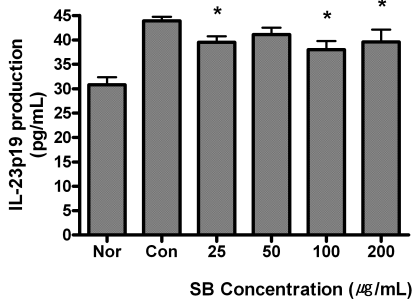


Fig. 6. Effect of SB on production of IL-23 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay.

Cells were incubated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and SB (0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Results are represented as mean \pm SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. * represents $p < 0.05$ compared to the control.

IV. 고 찰

황금(黃芩)의 기원은 “속썩은풀 Scutellaria baicalensis Georgi(꿀풀과 Labiatae)의 뿌리”로 대한약전¹⁸⁾에 나와 있으며, 그 주요한 성분으로는 flavonoid계 화합물로서 baicalein, biacalin, wogomin, wogonoside, wogonin glucuronide, neo-baicalein, koganebananin, dihydrobaicalin 등이 있으며 sterol류로서 β

-sitosterol, stigmasterol 등이 함유되어 있고, 당류로서 sucrose 및 D-glucose 등이 함유되어 있다¹⁹⁾.

황금은 쓴 맛(苦味)과 차가운 성질(寒性)을 가지고 있으며 폐(肺), 담(膽), 위(胃), 대장(大腸) 등의 경락으로 들어가서(歸經), 폐장(肺臟)과 관련부위의 열을 동반한 해수(肺熱咳嗽), 열이 심해지면서 의식이 소실되는 열병신혼(熱病神昏), 간장(肝臟)의 화(火)가 치성하여 생기는 두통(肝火頭痛), 눈이 빨개지면서 붓고 아픈 증세(目赤腫痛), 습열(濕熱)을 동반한 황달(濕熱黃疸), 이질류의 설사병(瀉痢), 배노시 작열감을 수반하는 열림(熱淋), 피를 토하거나 코피가 나는 토혈(吐血衄症), 여성의 과다한 자궁출혈(崩漏), 임신 중의 태열불안(胎熱不安), 옹종정창(癰腫疔瘡) 등을 치료하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

식균세포(食菌細胞) 혹은 탐식세포(貪食細胞)라고도 불리우는 대식세포(大食細胞; macrophage)는 조혈모세포로부터 분화되어 발달하는데, 혈액 내에서는 단핵구(monocyte)의 형태로 존재하며 혈액과 함께 혈관내로 온 몸을 흘러 다니다가 염증신호가 발생하는 부위에서 혈관 밖으로 이동, 염증부위에 접근하여 외부로부터 침입한 병원체, 혹은 염증을 유발하고 있는 유발체가 제거되도록 다양한 기능을 수행한다. 대식세포가 수행하는 대표적인 기능이 바로 사이토카인(cytokine, 면역 단백질)의 생성·배출이며 인터루킨(interleukin)은 대표적인 사이토카인이다. 인체 각 부위에 위치하며 아메바성운동을 통한 면역염증 반응을 수행하는 대식세포 중에 간장(肝臟) 부위에 있는 것은 쿠퍼세포(kupffer cell), 뇌

(brain) 및 척수(spinal cord)부위에 있는 것은 소교세포(microglia cell), 조직사이에 있는 것은 조직구(histiocyte), 폐장(肺臟)에 있는 것은 폐포대식세포(alveolar macrophage; dust cell), 뼈부위에 있는 것은 파골세포(osteoclast), 비장(脾臟; spleen)에 있는 것은 'Sinusoidal lining cells'이라고 한다. 대식세포가 병원체 등의 체내 이상물질을 제거하는 과정에서 자연스럽게 발생하는 것이 '염증반응(inflammatory reaction)'인데 과도하게 지속되는 염증반응은 전신성홍반성 낭창, 류마티스성 관절염 등의 자가면역질환으로 발전될 수 있다. 또한 최근에 문제가 되고 있는 인플루엔자성 급성호흡기염증질환에서 제어되지 못하는 '과잉염증반응'이 중요한 병리적 기전으로 이해되고 있다⁷⁻⁹⁾.

LPS는 포도상구균이나 연쇄상구균과 같은 그람음성균의 세포벽에 위치하는 지질다당체의 일종으로서 내독소(endotoxin)이라 불리우며, 면역세포 특히 대식세포로 하여금 염증촉발물질의 급격한 생성증가를 유발한다. 그러므로 항염제개발의 실험모델수립에 있어 LPS와 같은 내독소(endotoxin)에 의한 대식세포의 과도한 싸이토카인생성이 많이 이용된다²⁰⁾. 인터루킨(interleukin)은 그람음성세균에서 유래되는 지질다당체(LPS)에 의해 자극된 대식세포가 과잉생성하는 대표적인 염증촉발물질이다. 많은 종류의 인터루킨 중 IL-3의 경우에는 알러지성 질환에서 증가하는 것으로 알려져 있으며, IL-5는 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus)과 같은 자가면역질환에서 증가하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. IL-17은 최근 문제가 되고

있는 신종플루와 같은 급성호흡기염증질환에 있어서 혈액내 농도가 증가하는 것으로 알려져 있으며, IL-23은 건선(psoriasis)에서 증가하고²¹⁾, IL-9는 기도염증(airway inflammation)을 촉발하는 것으로 보고되어 있다²²⁾. IL-13과 같은 경우는 류마티스성 관절염(rheumatic arthritis)이나 다발성 경화증(Multiple sclerosis)과 같은 자가항체관련 자가면역질환(autoimmune disease with autoantibodies)의 경우에 혈중 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다²³⁾.

본 연구에서는 마우스 대식세포 RAW 264.7을 LPS로 24시간동안 배양, 자극하여 유도된 IL-3, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17, IL-23 생성증가에 대한 SB(25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 영향을 조사하였다. LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24 h 동안 유발된 RAW 264.7 cells의 IL-3, IL-5, IL-13, IL-17의 생성증가를 SB가 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 모두 유의($P<0.05$)하게 감소시켰으며, IL-23의 생성증가에 대해서는 SB가 25, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서만, IL-9의 생성증가에 대해서는 SB가 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서만 유의($P<0.05$)하게 감소시키는 것으로 나타났다. 이와 같은 실험결과는 SB가 인터루킨의 증가와 연관된 다양한 염증질환들, 예를 들면, IL-3 증가와 관련된 알러지성 질환, IL-5 증가와 관련된 루프스병, IL-17 증가와 관련된 호흡기염증질환, IL-13과 관련된 자가항체관련 자가면역질환 등의 치료에 응용될 수 있음을 의미한다. 그러므로 대식세포의 인터루킨 생성 조절능을 가진 SB를 이용하여 다양한 급만성염증질환의 증상완화 및 치료를 위한 새로운 약침치료법 개발을 위해 보다 정밀

한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 LPS로 유발되는 마우스 대식세포 인터루킨들(IL-3, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17, IL-23)의 생성증가에 대해 바실러스균 발효황금약침액(SB)이 미치는 영향을 알아보기 위한 *in vitro* 실험을 수행한 결과 다음을 알 수 있었다.

1. LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24 h 동안 유발된 RAW 264.7 cells의 IL-3의 생성증가($9.15 \pm 0.35 \text{ pg}/\text{mL}$)를 SB가 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 6.92 ± 0.05 , 7.21 ± 0.11 , 6.96 ± 0.33 , $7.45 \pm 0.74 \text{ pg}/\text{mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다.
2. LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24 h 동안 유발된 RAW 264.7 cells의 IL-5의 생성증가($7.30 \pm 0.48 \text{ pg}/\text{mL}$)를 SB가 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 6.50 ± 0.29 , 6.30 ± 0.25 , 6.30 ± 0.25 , $5.80 \pm 0.25 \text{ pg}/\text{mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다.
3. LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24 h 동안 유발된 RAW 264.7 cells의 IL-9의 생성증가($17.26 \pm 0.19 \text{ pg}/\text{mL}$)를 SB가 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서만 $15.01 \pm 0.43 \text{ pg}/\text{mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다.
4. LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24 h 동안 유발된 RAW 264.7 cells의 IL-13의 생성증가($187.80 \pm 2.90 \text{ pg}/\text{mL}$)를 SB가 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 152.80 ± 4.25 , 172.80 ± 3.97 , 162.10 ± 6.67 , $165.30 \pm 11.80 \text{ pg}/\text{mL}$

로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다.

5. LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24 h 동안 유발된 RAW 264.7 cells의 IL-17의 생성증가($18.30 \pm 0.95 \text{ pg}/\text{mL}$)를 SB가 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 13.30 ± 1.25 , 13.80 ± 1.11 , 13.30 ± 0.75 , $14.00 \pm 1.08 \text{ pg}/\text{mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다.
6. LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24 h 동안 유발된 RAW 264.7 cells의 IL-23의 생성증가($43.90 \pm 0.83 \text{ pg}/\text{mL}$)에 대해서는 SB가 25, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서만 각각 39.50 ± 1.26 , 38.00 ± 1.78 , $39.60 \pm 2.49 \text{ pg}/\text{mL}$ 로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다.

이상의 실험결과는 SB가 대식세포와 관련된 자가면역질환이나 과잉염증질환 등과 같은 급만성염증질환의 증상완화제로서의 응용가능성이 있음을 나타내는 것이며, 앞으로 SB를 이용한 급만성염증질환의 약침치료법 개발을 위하여 보다 심도 깊은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 경원대학교 연구비지원에 의하여 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. Alder JK, Georgantas RW 3rd, Hildreth RL, Kaplan IM, Morisot S, Yu X et al. Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in

- vivo. *J Immunol.* 2008; 180(8) : 5645-52.
2. Ryan JG, Kastner DL. Fevers, genes, and innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008 ; 321 : 169-84.
 3. Naito M. Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int.* 2008 ; 58(3) : 143-55.
 4. Gaschler GJ, Zavitz CC, Bauer CM, Skrtic M, Lindahl M, Robbins CS et al. Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 ; 38(2) : 218-26.
 5. Dissing-Olesen L, Ladeby R, Nielsen HH, Toft-Hansen H, Dalmau I, Finsen B. Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience.* 2007 ; 149(1) : 112-22.
 6. Lingnau M, Hflich C, Volk HD, Sabat R, Dcke WD. Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes. *Hum Immunol.* 2007 ; 68(9) : 730-8.
 7. Li L, Yi Z, Tisch R, Wang B. Immunotherapy of type 1 diabetes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008 ; 56(4) : 227-36.
 8. Gaschler GJ, Zavitz CC, Bauer CM, Skrtic M, Lindahl M, Robbins CS et al. Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 ; 38(2) : 218-26.
 9. Ping XD, Harris FL, Brown LA, Gauthier TW. In vivo dysfunction of the term alveolar macrophage after in utero ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007 ; 31(2) : 308-16.
 10. Bennett MK, Kirk CJ. Development of proteasome inhibitors in oncology and autoimmune diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2008 ; 11(5) : 616-25.
 11. Farasat S, Aksentijevich I, Toro JR. Autoinflammatory diseases: clinical and genetic advances. *Arch Dermatol.* 2008 ; 144(3) : 392-402.
 12. Danila MI, Hughes LB, Bridges SL. Pharmacogenetics of etanercept in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2008 ; 9(8) : 1011-5.
 13. Boyer JF, Cantagrel A, Constantin A. Impact of traditional therapies and biologics on cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008 ; 6(3) : 218-27.
 14. 吳普 等述, 孫星衍, 孫馮翼 輯. 神農本草經. 北京 : 科學技術文獻出版社. 1996 : 64.
 15. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 上海 : 上海科學技術出版社. 1999 : (7)200-10.
 16. Yoon SB, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae H, Kim HM, Ko SG, Choi HY, Oh MS, Park W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7

바실러스균 발효황금약침액이 Lipopolysaccharide로 활성화된
마우스 대식세포의 인터루킨 생성에 미치는 영향

- macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2009 ; 125(2) : 286-90.
17. Park WS. Effect of *Sacchomyces cerevisiae* -Fermented *Artemisiae Argi Folium* on Nitric oxide Production of Macrophage Treated with Toxicants. *동의생리병리학 회지.* 2009 ; 23(4) : 883-7.
18. 식품의약품안전청 고시 제2007-89. 대한 약전 제9개정. 2007 : 993-4.
19. 김호철. *한약약리학.* 경기 : 집문당. 2008 : 129-33.
20. Anzai M, Maezawai R, Ohara T, Kodama K, Fukuda T, Kurasawa K. Systemic lupus erythematosus associated with facial edema, overproduction of interleukin-5, and eosinophilia. *J Clin Rheumatol.* 2008 ; 14(6) : 361-2.
21. Gandhi M, Alwawi E, Gordon KB. Anti-p40 antibodies ustekinumab and briakinumab: blockade of interleukin-12 and interleukin-23 in the treatment of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg.* 2010 ; 29(1) : 48-52.
22. Temann UA, Laouar Y, Eynon EE, Homer R, Flavell RA. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int Immunol.* 2007 ; 19(1) : 1-10.
23. Spadaro A, Rinaldi T, Riccieri V, Taccari E, Valesini G. Interleukin-13 in autoimmune rheumatic diseases: relationship with the autoantibody profile. *Clin Exp Rheumatol.* 2002 ; 20(2) : 213-6.