大韓本草學會誌 제26권 제2호(2011년 6월)
Kor. J. Herbology 2011 ; 26(2) : 17-23

苦參 발효 추출물의 면역활성에 관한 연구

김형석#, 한효상, 이영종*

경원대학교 한의과대학 본초학교실

Studies on Immuno modulating Acitivity of Fermented Sophorae Radix Extract

Hyung-Seok Kim#, Hyo-Sang Han, Young-Jong Lee*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study aims at examining the effect of the fermentative extract of root of Sophorae Radix on the immuno-modulating activity.

Methods : Cell viabilities were measured by MTT assay. Effect of SFS on nitric oxide(NO), hydrogen peroxide production from RAW 264.7 cells was accessed by Griess reagent assay. Effect of SFS on productions of inflammatory cytokines such as TNF-α , IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 cells was accessed by a multiplex bead array assay based on xMAP technology.

Results : The results of the experiment are as follows.

1. As a result of carrying out MTT assay to check the cellular toxicity of the fermentative extract of Sophorae Radix. There was not any excessive toxicity to the macrophage when the fermentative extract of root of Sophorae Radix was treated in different concentrations.
2. The fermentative extract of Sophorae Radix increased the generation of hydrogen peroxide in the macrophage and significantly restored the suppression of the generation of the hydrogen peroxide in the macrophage induced by LPS.
3. The fermentative extract of Sophorae Radix reduced the generation of NO in the macrophage and significantly suppressed the increase of the generation of NO in the macrophage induced by LPS.
4. The fermentative extract of Sophorae Radix significantly decreased the amount of TNF-α generated in the macrophage induced by LPS when it was 25 μg/mL or higher.

Conclusion : These results suggest that SFS has anti-inflammatory moiety related with its inhibition of NO, hydrogen peroxide, TNF-α , IL-6, in macrophage led by LPS.

Key words : Sophorae Radix, fermentation, immuno-modulating activity, reactive oxygen species(ROS)

서 론

苦參은 『神農本草經』[1] 中品에 "苦參, 味苦寒. 主心腹結氣, 癥瘕積聚, 黃疸, 溺有餘瀝, 逐水, 除癰腫, 補中, 明目, 止淚. 一名水槐, 一名苦識, 生山谷及田野."라고 처음 收載되었으며, 임상에서 淸熱燥濕, 祛風殺蟲의 효능으로 濕熱瀉痢, 腸風便血, 黃疸, 小便不利, 水腫, 帶下, 陰痒, 疥癬, 麻風, 皮膚瘙痒, 濕毒瘡瘍 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다[2].

苦參의 기원으로 대한약전[3]에 "고삼 *Sophora flavescens* Solander ex Aiton(콩과 Leguminosae)의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것"이라고 수재되어 있으며, 『중국약전』[4], 『일본약전』[5], 『북한약전』[6], 『대만약전』[7] 모두 동일하게 고삼 *S. flavescens* 단일종으로 되어 있다.

苦參의 성분으로는 여러 종류의 alkaloid가 함유되어 있는데, 그 주성분은 matrine, oxymatrine, N-oxy-sophocarpine, sophoranol N-oxide, supanine, anagyrine 등이다.[8] 또한 flavonoid로서 kushenol H, kushenol K, kurarinol,

*교신저자 : 이영종. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : 031-750-5415. · E-mail : garak@kyungwon.ac.kr.
· 접수 : 2011년 5월 11일 · 수정 : 2011년 6월 3일 · 채택 : 2011년 6월 10일

sophoflavescenol 및 kuraridine 등이 함유되어 있다. 기타 triterpene계의 saponin으로서 soyasapogenol B가 함유되어 있다.[9]

약리작용으로는 심혈관계에 대한 작용[10], 당뇨병개선효능[11], 항위염 작용[12], 항염증 작용[13], 항균 작용[14], 항암활성 작용[15], 발모촉진 작용[16] 등이 보고되었다.

발효한약은 전통발효공법을 통해 한약재를 미생물이 잘 이용할 수 있게 찌거나 삶은 다음, 공기 중의 미생물 또는 유산균과 같은 순수 분리 미생물을 이용하여 발효한 한약재를 말한다. 이는 한약재 약효성분의 체내흡수율과 생체 이용률을 모두 극대화시킨 일종의 가공방법으로 약리적 기능성뿐만 아니라 한약의 제형개량과 포제방법을 향상시킬 수 있고 이를 통해 한약의 새로운 수요를 창출하고 고부가가치의 새로운 한약제품을 개발할 수 있다는데 그 의의를 두고 있다.[17]

이에 著者는 본 연구에서 苦參을 *Saccharomyces cerevisiae* STV89(효모)로 발효 추출하여 제조한 시료 SFS로 마우스 Raw 264.7 cell을 이용한 cell viability, 세포내 hydrogen peroxide 생성, NO 생성, 그리고 cytokines (TNF-α , IL-6 등) level에 미치는 영향을 측정한 결과 SFS는 대식세포에 세포독성을 과도히 유발하지 않으면서 대식세포의 hydrogen peroxide 생성을 증가시키고 대식세포의 NO 생성을 감소시켰다. 특히 LPS(lipopolysaccharide)로 유발된 대식세포의 TNF-α 와 IL-6 생성을 억제하는 등 유의한 면역활성을 나타내었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 苦參(Sphorae Radix)은 서울의 경동시장에서 2007년 10월에 구입하였으며, 약재는 경원대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고 모든 약재는 쓰기 전에 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다. 苦參의 발효에 사용한 균주로는 *Saccharomyces cerevisiae* STV89(효모)를 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 mouse 대식세포(Raw 264.7 cell line)이며 한국 세포주 은행 (KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해서 ethyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), DMSO(Sigma, USA), DMEM(Sigma, USA), 1×PBS(Sigma, USA), EDTA(Sigma, USA), isopropanol(Sigma, USA), trypsin-EDTA(Sigma, USA), Bio-Plex cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용되었다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO_2 incubator(NUAIRE, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), air compressor(Tamiya, Japan), homogenizer(Omni, USA), centrifuge(Hanil, Korea), fume hood(Hanil, Korea), clean bench(Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader(Bio-Rad, USA), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(iNtRON biotech, Korea), ice-maker(Vision Scientific Co, Korea) 등이다.

2. 방법

1) 시료의 제조

(1) 苦參 추출물 제조

苦參 50 g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 환류추출기에 1차 증류수 2,000 mL와 함께 넣은 뒤 탕액이 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper(Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 9.5g을 얻었으며, 수율은 19%였다.

(2) 苦參 발효 추출물(SFS) 제조

위에서 제조된 苦參 추출물을 이용하여 다음과 같이 苦參 발효 추출물을 제조하였다.

① 조효소 조제 : 조효소제인 α -Herbzyme(한국효소) 3 g에 증류수 100 mL를 가하고 37℃에서 30분간 침출하여 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.
② 열수출하여 건조한 苦參(3.0 g, pH:4.67)을 screw cap tube에 담고 미리 추출된 조효소액 2.2 mL를 첨가하여 37℃에서 2시간 효소반응하였다.
③ 효소반응 후 95℃에서 10분간 살균하였다.
④ *Saccharomyces cerevisiae* STV89를 苦參에 4%씩 접종하여 *Saccharomyces cerevisiae* STV89는 30℃에서 4일간 배양하였다.
⑤ 배양 후 60℃에서 20분간 열처리하였다.
⑥ *Saccharomyces cerevisiae* STV89로 배양한 후 pH는 4.66였다.

2) 세포 배양

Raw 264.7 cells을 37℃, 5% CO_2 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 μg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다.

3) 세포독성 검사(cytotoxicity assay)

준비된 시료가 Raw 264.7 cells에 나타내는 세포독성 유발 효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 cell을 100 $\mu\ell$씩 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료(25, 50, 100, 200 μg/mL)를 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에

녹인 1 ㎎/mL MTT(Sigma, USA)를 100 ㎕씩 각 well에 처리하여 알루미늄호일로 차광시킨 후 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 ㎕ 처리하고 37℃에서 2시간 방치 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산하였다.

Cell viability(%) = 100 × AT / AC
AC : absorbance of control
AT : absorbance of tested extract solution.

4) Hydrogen peroxide(H_2O_2) assay

세포내의 hydrogen peroxide(H_2O_2)는 dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 이용하여 측정하였다. 96 well plate 1×10^4 cells/well의 cell을 100 ㎕씩 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어주었다. LPS와 시료를 처리하기 전에 우선 DHR(10 uM)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하였다. LPS를 단독처리(2 ㎍/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200 ㎍/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포내 H_2O_2 생성은 다음 공식으로 계산하였다.

Intracellular Productions of H_2O_2(%) = 100 × AT / AC
AC : absorbance of control
AT : absorbance of tested extract solution.

5) Nitric oxide(NO) 생성 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(griess reagent : 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 추정하기 위해 microplate reader를 이용, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생성정도를 비교하였다. 이를 위해 다음과 같이 실험하였다. LPS를 단독처리(2 ㎍/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200 ㎍/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 ㎕을 채취하여 여기에 그리스 시약 100 ㎕을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 nitric oxide 생성은 다음 공식으로 계산하였다.

Productions of Nitric oxide(%) = 100 × AT / AC
AC : absorbance of control
AT : absorbance of tested extract solution.

6) 면역단백질(cytokines)에 대한 Bio-Plex Cytokine Assay

면역단백질 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Anderson 등[18]의 방법을 응용하여 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에 1×10^5 cells/mL의 cell을 100 ㎕씩 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS를 단독처리(2 ㎍/mL)하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100 ㎍/mL)와 함께 배지에 담아 처리하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상층액을 채취하여 Bio-Plex Suspension Array System의 Bio-Plex Cytokine Assays를 실시하여 면역단백질들(TNF-α , IL-6)의 발현에 대한 시료의 영향을 계산, 비교하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 ± 표준오차(mean ± SD)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test와 ANOVA test로 분석하여 p-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

성 적

1. SFS가 대식 세포에 미치는 영향

1) Cytotoxicity

SFS가 대식 세포의 증식에 미치는 영향을 비교하였다. 24시간 처리한 결과 25 ㎍/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 감소는 없었다(Fig. 1).

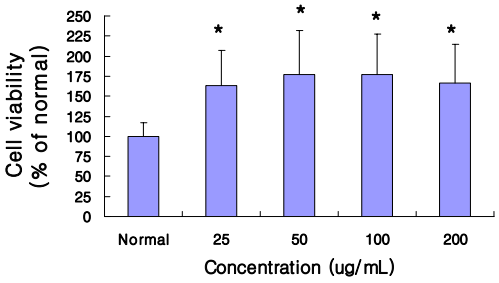

Fig. 1. Effect of SFS on cell viability of Raw 264.7 cell. Cells were incubated for 24 hr. Results are represented as mean±SD.
SFS : Water extract of Sophorae Radix Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with SFS.
* represents $P < 0.05$ compared to the normal.

2) Hydrogen peroxide(H_2O_2)의 생성

(1) Hydrogen peroxide(H_2O_2)의 생성

SFS가 대식세포의 hydrogen peroxide(H_2O_2)의 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24시간에서 25 ㎍/mL 이상일 때 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 2).

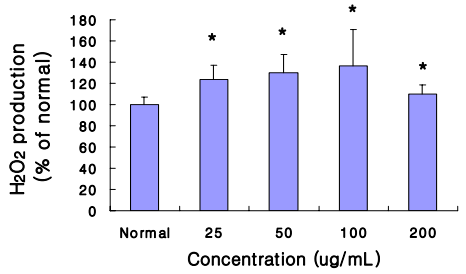

Fig. 2. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide of Raw 264.7 cell. Cells were incubated for 24 hr. Results are represented as mean±SD.
SFS : Water extract of Sophorae Radix Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with SFS.
* represents $P < 0.05$ compared to the normal.

(2) LPS로 유발된 Hydrogen peroxide(H_2O_2) 생성감소에 대한 영향

SFS가 LPS로 유발된 대식세포의 hydrogen peroxide(H_2O_2)의 생성 감소에 미치는 영향을 비교하였다. 24시간에서 모두 LPS 단독으로 배양한 경우 Normal 군보다 유의하게 H_2O_2 생성이 감소하였으며 LPS와 SFS을 함께 배양한 경우 SFS의 농도가 50 ㎍/mL이상일 때 LPS에 의한 감소를 유의하게 회복하였다(Fig. 3).

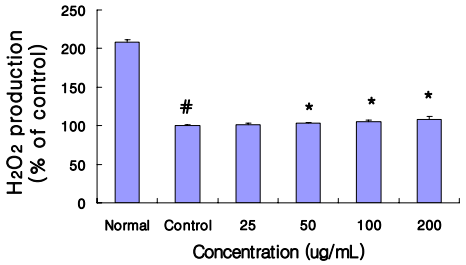

Fig. 3. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide of Raw 264.7 cell treated with lipopolysaccharide(2 ㎍/mL). Cells were incubated for 24 hr. Results are represented as mean±SD.
SFS : Water extract of Sophorae Radix Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with LPS.
Control : Treated with Lipopolysaccharide(2.0 ㎍/㎖) only.
represents $P < 0.05$ compared to the normal.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

3) Nitric oxide(NO)의 생성

(1) Nitric oxide(NO)의 생성

SFS가 대식세포의 nitric oxide(NO)의 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 4시간의 배양에서는 25, 50, 200 ㎍/mL일 때 유의한 감소를 나타내었으며, 24시간의 배양에서는 25 ㎍/mL이상일 때 모두 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 4).

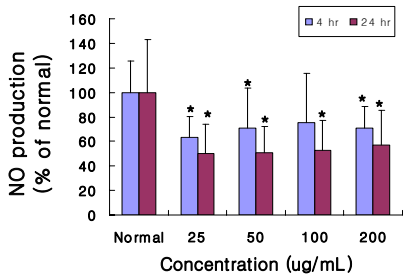

Fig. 4. Effect of SFS on the nitric oxide production of Raw 264.7 cell. Cells were incubated for 4, 24 hr. Results are represented as mean±SD.
SFS : Water extract of Sophorae Radix Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with SFS.
* represents $P < 0.05$ compared to the normal.

(2) LPS로 유발된 nitric oxide(NO) 생성증가에 대한 영향

SFS가 LPS로 유발된 대식세포의 nitric oxide(NO)의 생성 증가에 미치는 영향을 비교하였다. 24시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 Normal 군보다 유의하게 NO생성이 증가하였으며 LPS와 SFS을 함께 배양한 경우 SFS의 농도가 50, 100 ㎍/mL일 때 LPS에 의한 증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 5).

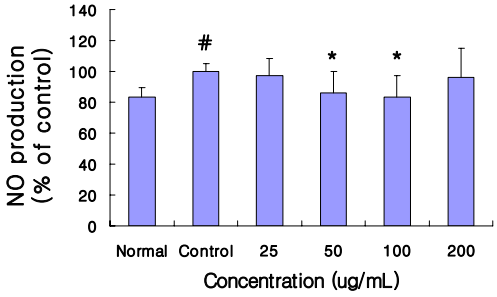

Fig. 5. Effect of SFS on the nitric oxide production of Raw 264.7 cell treated with lipopolysaccharide(2 ㎍/mL). Cells were incubated for 24 hr. Results are represented as mean±SD.
SFS : Water extract of Sophorae Radix Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with LPS.
Control : Treated with Lipopolysaccharide(2.0 ㎍/㎖) only.
represents $P < 0.05$ compared to the normal.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

4) LPS로 유발된 면역단백질 생성증가에 대한 영향

(1) TNF-α 생성증가에 대한 영향

SFS가 LPS로 유발된 대식세포의 TNF-α 생성 증가에 미치는 영향을 비교하였다. 3시간에서 LPS 단독으로 배양한 경우 Normal 군보다 유의하게 TNF-α 생성이 증가하였으며 LPS와 SFS을 함께 배양한 경우 SFS의 농도가 25 ㎍/mL이상일 때 모두 LPS에 의한 증가를 유의하게 감소시켰다(Fig. 6).

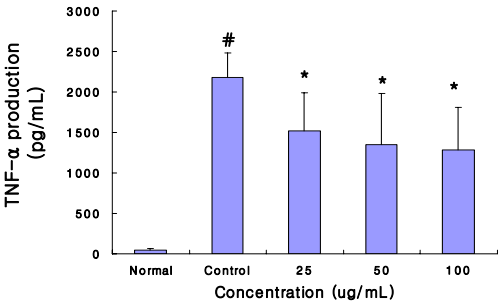

Fig. 6. Effect of SFS on TNF-α production of Raw 264.7 cell treated with lipopolysaccharide(2 ㎍/mL). Cells were incubated for 3 hr. Results are represented as mean±SD.
SFS : Water extract of Sophorae Radix Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with LPS.
Control : Treated with Lipopolysaccharide(2.0 ㎍/㎖) only.
represents $P < 0.05$ compared to the normal.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

(2) IL-6 생성증가에 대한 영향

SFS가 LPS로 유발된 대식세포의 IL-6 생성 증가에 미치는 영향을 비교하였다. 3시간에서 LPS 단독으로 배양한 경우 Normal 군보다 유의하게 IL-6 생성이 증가하였으며 LPS와 SFS을 함께 배양한 경우 SFS의 농도가 25 ㎍/mL 이상 일 때 모두 LPS에 의한 증가를 유의하게 감소시켰다(Fig. 7).

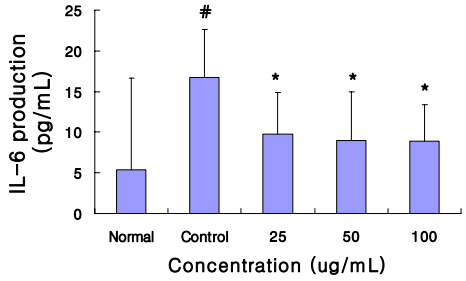

Fig. 7. Effect of SFS on the IL-6 production of Raw 264.7 cell treated with lipopolysaccharide(2 ㎍/mL). Cells were incubated for 3 hr. Results are represented as mean±SD.
SFS : Water extract of Sophorae Radix Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with LPS.
Control : Treated with Lipopolysaccharide(2.0 ㎍/mL) only.
represents $P < 0.05$ compared to the normal.
* represents $P < 0.05$ compared to the control.

고 찰

苦參의 기원으로 『대한약전』[3]에 "고삼 *Sophora flavescens* Solander ex Aiton(콩과 Leguminosae)의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것"이라고 수재되어 있으며, 『중국약전』[4], 『일본약전』[5], 『북한약전』[6], 『대만약전』[7] 모두 동일하게 고삼 *S. flavescens* 단일종으로 되어 있다.

苦參은 『神農本草經』[1] 中品에 "苦參, 味苦寒. 主心腹結氣, 癥瘕積聚, 黃疸, 溺有餘瀝, 逐水, 除癰腫, 補中, 明目, 止淚. 一名水槐, 一名苦識, 生山谷及田野."라고 처음 收載되었으며, 『名醫別錄』[19]에 "治惡瘡, 下部慝, 平胃氣,令人嗜食, 輕身."이라고 하였고 李時珍[20]은 "苦以味名, 參以功名, 槐似葉形名也"라고 한 이래 味苦 性寒[20]하고, 淸熱燥濕, 祛風殺蟲의 효능으로 濕熱瀉痢, 腸風便血, 黃疸, 小便不利, 水腫, 帶下, 陰痒, 疥癬, 麻風, 皮膚瘙痒, 濕毒瘡瘍 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다[2].

苦參의 성분으로는 여러 종류의 alkaloid가 함유되어 있는데, 그 주성분은 matrine, oxymatrine, N-oxy-sophocarpine, sophoranol N-oxide, supanine, anagyrine 등이다.[8] 최근의 연구에 의하면 고삼에서 분리한 flavonoid 성분인 8-lavandulylkaempferol가 free radical과 $ONOO^-$를 제거하는 능력이 있는 것으로 보고된 바 있으며, lavanduly flavanones성분인(2S)-2'-methoxykurarinone, sophra-flavanone G, leachianone A 및 (-)-kurarinone 등이 항말라리아 활성을 가진다는 보고도 있다.[12]

약리에 대한 연구로는 Yamahara 등[10]은 심혈관계에 대한 작용을, 김[11]은 당뇨병개선효능을, 강 등[12]은 항위염 작용을, Yamaguchi-Miyamoto 등[13]은 항염증 작용을, 안 등[14]은 항균 작용을, 조 등[15]은 항암활성 작용을, Roh 등[16]은 발모촉진 작용을 보고 하였다.

최근 한의학계에서도 발효한약이라는 제제를 도입하여 임상에서 사용하고 있으나 아직 탕약이 주된 제형으로 사용되는 추세여서 발효 한약은 다소 생소한 이름이다. 하지만 환자들을 치료하는데 좀 더 나은 방법이 있다면 새로운 제제로의 접근도 의미 있을 것으로 생각된다[21].

이에 著者는 발효한약의 유의성을 적용하여 苦參을 발효 추출하여 만들어진 시료 SFS로 마우스 대식세포를 이용한 cell viability, 세포내 hydrogen peroxide 생성, NO 생성, 그리고 cytokines(TNF-α 와 IL-6 등) level에 미치는 영향을 측정하였다.

발효미생물 *Saccharomyces*계통은 생화학적 성질이 일정하고, 물에 잘 분산되며, 자기소화에 대한 내성이 있어서 보존성이 좋고, 당밀배지에서 증식속도가 빠르고 수득률이 높다는 등의 성질이 있다[22]. 이에 본 실험에서는 *Saccharomyces cerevisiae* STV89(효모)를 균주로 이용하여 발효하였다.

본 연구에서는 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)으로부터 분양받은 Raw 264.7 cells에 발효 苦參 추출물을 25, 50, 100, 200 ㎍/mL의 농도로 처리한 뒤에 24시간 동안 37℃에서 배양한 후, 세포의 증식을 MTT assay를 이용하여 확인한 결과 대조군에 비하여 苦參 발효 추출물이 Raw 264.7 cells에 유의한 세포증식률 감소를 일으키지 않았으며 이는 발효 苦參 추출물이 세포독성을 과도히 유발하지 않는다는 것으로 볼 수 있다.

Hydroperoxide(H_2O_2)는 세포내에서 발생하는 reactive oxygen species(ROS)의 일종이며 일반적으로 세포의 산화적 stress를 유발하는 인자로 알려져 있다. 또한 인체의 면역기능과도 중요한 관계에 있다. 즉 인체 내의 염증반응이 커지면 neutrophils 등의 세포는 hydrogen peroxide 생성을 많이 하고 이는 immunologic reaction을 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근의 연구에서는 대식세포의 hydrogen peroxide 생성 증가가 T-cell과 관련된 arthritis를 억제하는 등 자가면역질환 발생을 방어하는 작용이 있음이 보고되었다[23-25]. SFS가 대식세포의 hydrogen peroxide(H_2O_2)의 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24시간에서 25 ㎍/mL 이상일 때 유의한 증가를 나타내었다. LPS와 SFS을 함께 배양한 경우 SFS의 농도가 각각 50 ㎍/mL 이상일 때 LPS에 의한 감소를 유의하게 회복하였다. 이와 같이 SFS에 의해 대식세포의 H_2O_2이 증가함은 SFS가 자가 면역 질환 발생 억제제로서의 가능성이 있음을 의미하는 것이다.

Nitric oxide는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 만들어지며, NOS는 항상성 유지에 필요한 NO를 생성하는 endothelial NOS(eNOS) 및 neuronal NOS(nNOS)와 염증성 인자 등에 의해 유도되는 inducible NOS(iNOS)로 분류할 수 있다.[26] SFS가 대식세포의 nitric oxide(NO)의 생성에 미치는 영향을 비교하였는데 4시간의 배양에서는 25, 50, 200 ㎍/mL일 때 유의한 감소를 나타내었고, 24시간의 배양에서는 25 ㎍/mL이상일 때 모두 유의한 감소를 나타내었다. 24시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 Normal 군보다 유의하게 NO생성이 증가하였으며 LPS와 SFS을 함께 배양한 경우 SFS의 농도가 50, 100 ㎍/mL일 때 LPS에 의한 증가를 유의하게 억제시켰다. 이와 같이 SFS에 의해서 LPS에 의해 유발된 대식세포의 NO 배출증

가를 억제함은 SFS가 염증 반응 억제의 효능이 있음을 의미한다.

싸이토카인은 한 세포에서 생산되어 다른 세포의 형태에 영향을 미치는 단백으로 림프구에서 생산되는 싸이토카인을 림포카인(lymphokine) 또는 인터루킨(interleukin, IL)이라고 한다. 싸이토카인은 표적세포의 특이 수용체와 결합한다.[27)]

TNF-α 는 활성화된 대식세포에 의하여 주로 생성되며, 세균감염이나 악성 종양 발생 시 숙주의 반응에 있어서 중요한 역할을 한다.[28,29)] SFS가 LPS로 유발된 대식세포의 TNF-α 생성 증가에 미치는 영향을 비교했을 때 3시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 Normal 군보다 유의하게 TNF-α 생성이 증가하였으며 LPS와 SFS을 함께 배양한 경우 SFS의 농도가 25 μg/mL이상일 때 모두 LPS에 의한 증가를 유의하게 감소시켰다.

IL-6는 단핵 대식세포, 혈관내피세포, 섬유세포 및 T-cell에서 만들어지며, 많은 기능과 효과를 나타낸다.[30)] SFS가 LPS로 유발된 대식세포의 IL-6 생성 증가에 미치는 영향을 비교하였는데 3시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 Normal 군보다 유의하게 IL-6 생성이 증가하였으며 LPS와 SFS을 함께 배양한 경우 SFS의 농도가 25 μg/mL 이상 일 때 모두 LPS에 의한 증가를 유의하게 감소시켰다.

SFS에 의해서 LPS에 의해 유발된 대식세포의 TNF-α 와 IL-6 생성 증가가 억제됨은 SFS가 cytokine 발현조절을 통한 염증 반응 조절의 효능이 있음을 의미한다.

이상의 결과, 苦參 발효 추출물 SFS는 대식세포에 세포독성을 과도히 유발하지 않으면서 대식세포의 hydrogen peroxide 생성을 증가시키고 대식세포의 NO 생성을 감소시켰으며 특히 LPS로 유발된 대식세포의 TNF-α 와 IL-6 생성을 억제하는 등 유의한 면역활성이 있음을 알 수 있었다. 앞으로 苦參 발효 추출물을 이용한 대식세포 연관 면역질환 치료제로의 개발을 위하여 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

苦參을 *Saccharomyces cerevisiae* STV89(효모)로 발효 추출한 후 얻은 추출시료 SFS로 마우스 Raw 264.7 cell을 이용한 cell viability, 세포내 hydrogen peroxide 생성, NO 생성, 그리고 cytokines(TNF-α 와 IL-6 등) level에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 苦參 발효 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 苦參 발효 추출물을 농도별로 처리했을 때 대식세포에 독성을 과도히 유발하지 않았다.

2. 苦參 발효 추출물은 대식세포의 세포내 hydrogen peroxide 생성을 증가시켰으며 LPS로 유발된 대식세포내의 hydrogen peroxide 생성억제를 유의하게 회복시켰다.

3. 苦參 발효 추출물은 대식세포의 NO의 생성을 억제하였으며 LPS로 유발된 대식세포의 NO 생성증가를 유의하게 억제하였다.

4. 苦參 발효 추출물은 LPS에 의해서 유발된 대식세포의 TNF-α 및 IL-6 생성량을 25 μg/mL 이상에서 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과, 苦參으로 제조된 발효 추출물 SFS는 대식세포에 세포독성을 과도히 유발하지 않으면서 대식세포의 hydrogen peroxide 생성을 증가시키고 대식세포의 NO 생성을 감소시켰으며 특히 LPS로 유발된 대식세포의 TNF-α 와 IL-6 생성을 억제하는 등 유의한 면역활성을 가진 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 경원대학교 연구비 지원을 받았기에 감사드립니다.

참고문헌

1. Sun XY, Sun FY. Shen nong ben cao jing. Beijing:Kexue jishu wenxian chuban she. 1999:59.
2. Guojia zhong yiyao guanli ju ≪Zhonghua bencao ≫ bian wei hui. Zhonghua bencao. Shanghai:Shanghai kexue jishu chuban she:1999:(4)634-43.
3. Korean Food and Drug Adminstration Notification 2007-89. The Korean Pharmacopoeia. 2007:909.
4. Guojia yaodian weiyuanhui. The Chinese Pharmacopoeia. Beijing:Huaxue gongye chuban she. 2005:161-2.
5. The Society of Japanese Pharmacopoeia. The Japanese Pharmacopoeia. Tokyo:Hirokawa shoten. 1996:1203-4.
6. The DPRK Pharmacology Committee. The DPRK Pharmacopoeia. Pyungyang: Medicine Science pulisher. 1996:130.
7. Xingzheng yuan weisheng shu zhong yiyao weiyuanhui, Zhongyaodian bianji weiyuanhui. The Taiwanese Pharmacopoeia. Taibei:Dachang yinshua youxian gongsi. 1985:98-100.
8. Kim HC. The Pharmacology of Medicinal Herbs. Seoul: Jibmundang. 2001:141-3.
9. Herbal Pharmacology Compilation Committee. Herbal Pharmacology. Seoul: Shinil Books. 2006:409-13.
10. Yamahara J, Kobayashi G, Iwamoto M, Chisaka T, Fujimura H, takaishi Y, Yoshida M, Tomimatsu T, Tamai Y. Vasodilatory active principles of Sophora flavescens root. J Ethnopharmacol. 1990;29:79-85.
11. Kim JH. Effects of Sophorae Radix on

streptozotocin-induced rats with the following results. Daegu Hanny University. 1991.
12. Kang MH, Lee JH, LEE JH, Cho, SY, Choi JS, Kim YS, Kang SS, Jeong CS. Antigastritic and Anti Helicobacter pylori of Trifolirhizin from Sophora Radix. Korean Journal of Pharmacognosy. 2006;37(4):266-71.
13. Yamaguchi-Miyamoto T, Kawasuji T, Kuraishi Y, Suzuki H. Antipruritic Effects of Sophora flavescens on Acute Chronic Itch-Related Responses in Mice. Biol Pharm Bull. 2003; 26:722-4.
14. Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA. Isolation and Identification of Antimicrobial Active Substance from Sophora flavescens Ait. Korean journal of food science and technology. 1998;30(3):672-9.
15. Cho H, Yeong EY, Kim JS, Yoo IS, Ryu DG, Kang KU, Lee JH Baek SH. Studeis on the Cytotoxicity of Sophora flavescens Ait. Extract Against L1210 and P388D1 Cells (II) . Korean Journal of Pharmacognosy. 1999;30(4):351-4.
16. Roh S, Kim C, Lee M, Hwang S, Rang M, Yoon Y. The hair growth promoting effect of Sophora flavescens extract and its molecular regulation. J Dermatol Sci. 2002;30:43-9.
17. Jung YJ, Han DO, Choi BH, Park C, Lee HJ, Kim SH, Hahm DH. Effect of Fermented Herbal Extracts, HP-1 on Enzyme Activities and Gene Expressions Related to Alcohol Metabolism in Ethanol-loaded Rats. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2007;21(2):387-91.
18. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. Hum Reprod.. 2007;22(11):2928-35.
19. Tao HJ. Ming yi bie lu. Beijing:Ren min wei sheng chu ban she. 1986:128-9.
20. Li SZ. Ben cao gang mu. Beijing:Ren min wei sheng chu ban she. 1982:798-802.
21. Cho IS, Kim HW, Lee GJ. Biological Activities of Extracts of Fermented Camellia japonica Leaf and Flower. The Korea journal of herbology. 2006;21(2):55-62.
22. Ha DM. Fermantation Techonology. Seoul:Munwundang,. 1994:288.
23. Gelderman KA, Hultqvist M, Pizzolla A, Zhao M, Nandakumar KS, Mattsson R, Holmdahl R. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. J Clin Invest. 2007;117(10):3020-8.
24. Hultqvist M, Bäcklund J, Bauer K, Gelderman KA, Holmdahl R. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. J Immunol. 2007;179(3):1431-7.
25. Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Bäckström BT, Tordsson J, Holmdahl R. Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(34):12646-51.
26. Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthase. Biochem Biophys Acta 1999 May;1411(2-3): 217-30.
27. Parham P. The Immune system. Seoul: Life Science. 2006:454.
28. Trace KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. Ann N Y Acad Sci. 1990;587: 325-31.
29. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. Crit Care Med. 1993;21:S423-35.
30. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol. 1993;54: 1-78.