

동의보감에 수재된 烏鷄에 대한 생리활성 연구

김진우^{1#}, 심부용², 최학주², 이해진², 김동희^{1,2*}

1 : 대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2 : 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터

The Study on Biological Activities of Yeonsan Ogye listed on Dong-ui-bo-gam

Jin-Woo Kim^{1#}, Boo-Yong Sim², Hak-Joo Choi², Hea-Jin Lee², Dong-Hee Kim^{1,2*}

1 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

2 : Traditional and Biomedical Research Center(TBRC RIC), Daejeon University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study is to investigate cell viability, anti-inflammatory, antioxidant, immuno-enhancing activity using various extracts of Yeonsan Ogye.

Methods : In order to evaluate cytotoxicity, MTT assay was performed. We investigated production levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6, and nitric oxide(NO) in LPS-induced RAW 264.7 cells. NO production in RAW 264.7 cells was measured by using Griess reagent. Cytokines including IL-6 and TNF- α were measured by Luminex and ROS was measured by Flow cytometry.

Results : No cytotoxicity of various extracts of Yeonsan Ogye was observed in RAW 264.7 cells. Productions of ROS in RAW 264.7 cells were increased from extraction of bones and decreased from extraction of skin. Also, productions of NO in RAW 264.7 cells were increased to bone extract and decreased at skin extract. In addition, productions of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) in LPS-induced RAW 264.7 cells were decreased at skin, meat extracts, respectively. Finally, the levels of immune-related cytokines (IL-6 and TNF- α) were increased compared to those of the normal group.

Conclusions : It is concluded that Yeonsan Ogye extracts seem to have significant biological activities likes anti-inflammatory, antioxidant, immuno-enhancing etc. These results may be developed as a raw material for new health food and new therapeutics to ease the symptoms related with inflammatory and oxidative stress. In terms of oriental traditional medicine, we expect that it contribute to building of EBM (Evidence-Based Medicine) from the this result.

Key words : anti-inflammatory, antioxidant, Biological Activities, immuno-enhancing activity, Yeonsan Ogye

서론

한의학에 대한 현대적인 탐구가 활발히 이루어지고 있는 오늘날에도 동의보감, 본초강목, 신농초본경 등의 고문헌은 임상, 교육, 연구 현장에서 중요한 텍스트로 활용되고 있다¹⁾. 또한, 고문헌에 제시된 약재들은 일상생활에서 건강기능식품, 천연물, 식재료 등으로 쉽게 접할 수 있으나 아직까지도 과학적인 검증을 필요로 하는 소재들이 많은 실정이다.

烏鷄는 《東醫寶鑑 湯液編》에 烏雄鷄肉이라 하여 "性微溫, 無毒. 主心病吐病, 除心腹惡氣, 及風濕癱痺. 補虛羸, 安胎. 治折傷, 并癰疽"라고 기재되어 있으며²⁾, 《東醫寶鑑 雜病編》에서는 "治中風語澁, 及風寒濕痺"로 기재되어 있어³⁾, 다양한 효능이 있음을 나타내고 있다.

이미 해외에서는 오골계의 생리활성에 대한 효능 검증을 통해 천연물 신약개발에 연구를 활발히 진행하고 있으며, 새로운 항산화물질이 다량 함유된 슈퍼푸드(superfood)로 각광

*Corresponding author : Dong-Hee Kim, Traditional and Biomedical Research Center(TBRC RIC), Daejeon University
· Tel : +82-42-280-2623 · Fax : +82-42-280-2624 · E-mail : dhkim@dju.kr

#First author : Jin-Woo Kim, Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

· Tel : +82-42-280-2828 · E-mail : kjw1204@jpdco.kr

· Received : 24 August 2015 · Revised : 17 September 2015 · Accepted : 18 September 2015

받고 있어 다양한 음식과 건강기능식품 등의 제품개발을 통한 상품화가 시도되었다.

반면 連山烏鷄는 단백질이 풍부한 식품으로 알려져, 허약자를 위한 건강식으로 주로 탕으로써 이용되어 지고 있으나⁴⁾, 사육의 어려움, 저수익성으로 인해 수요가 많지 않고 연산오계에 대한 다양한 연구가 이루어지지 않아 식·의약품으로써의 기능성 소재화에 대한 제품 개발은 매우 미비한 실정이다.

본 시료에 대한 국내 연구로는 채 등⁴⁾의 오골계와 십전대보탕의 증탕액이 흰쥐의 혈중 호르몬, cytokine 및 특이항체에 미치는 영향을 연구하였으나, 연산오계 자체로만 진행된 연구는 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는 《東醫寶鑑》에 수재된 오계의 효능에 착안하여 연산오계 수탕을 부위별로 나누어 다양한 생리활성 연구를 통해 오계의 효능을 과학적으로 입증함과 동시에 오계의 활용방안을 다각화하기 위한 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 연산오계(Yeonsan Ogye 이하, YO로 표기)는 1년산 수탉을 지산농원(Chungnam, Korea)에서 구입하였고, 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선 후 사용 하였다.

2. 시약 및 기기

사용된 시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum : FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), (2,7)-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.)을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

3. 시료 추출

YO를 뼈, 살, 껍질로 분리하여 각 30 g에 물 500 ml을 넣고 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축 하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 뼈는 3.7 g, 살은 1.6 g, 껍질은 4.9 g의 분말을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

4. 세포 배양

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 동결된 RAW 264.7 세포를 50 ml 튜브에 옮기고 PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켜 세포배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 배양하였으며, 계대배양 횟수는 5회 이상 으로 하였다.

5. 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 1.5×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 새로운 배양액으로 교체한 후 부위별 YO를 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도의 변화를 측정한 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

6. 세포 내 Reactive oxygen species (ROS)

생성 측정

세포 내 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10⁵ cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, 부위별 YO를 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도와 LPS를 1 μg/ml의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA는 10 μM이 되도록 첨가하여 15분 동안 암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

7. Nitric oxide(NO) 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitric oxide 농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.5×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후 새로운 배양액으로 교체 하였고 부위별 YO를 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도와 LPS를 1 μg/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer와 N2 buffer를 각각 10분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

8. 세포 내 cytokine 측정

12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10⁵ cells/well이

되게 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, 항염증 효과 검증은 부위별 YO를 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였으며 면역증진 효과 검증은 부위별 YO를 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 처리한 후 다시 24시간 동안 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 원심분리 후 상청액으로 IL-6, TNF- α 를 luminex 기기로 측정하였다.

9. 통계처리

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test 및 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였으며 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포 특성

대조군을 $100.0 \pm 4.8\%$ 로 나타냈을 때, YO의 뼈는 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $99.8 \pm 8.6\%$, $92.4 \pm 6.8\%$, $104.1 \pm 6.0\%$ 의 세포 생존율을 나타내었으며, YO의 살은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $100.6 \pm 3.5\%$, $119.8 \pm 7.2\%$, $124.7 \pm 6.8\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, YO의 껍질은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $127.6 \pm 3.7\%$, $116.2 \pm 1.8\%$, $126.8 \pm 2.2\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

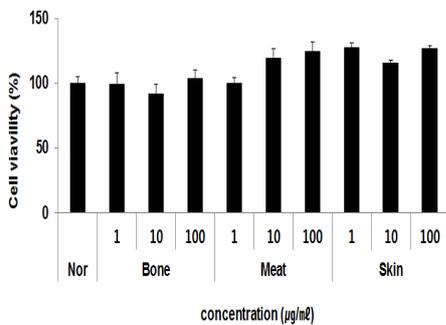


Fig. 1. Effect of various extracts of YO on the cell viability of RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D.

2. 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향

대조군을 $100.0 \pm 8.1\%$ 로 나타냈을 때 YO의 뼈는 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $234.6 \pm 1.1\%$, $136.2 \pm 1.2\%$, $103.6 \pm 2.0\%$ 의 생성을 나타내었으며, YO의 살은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $91.8 \pm 10.3\%$, $108.2 \pm 8.1\%$, $179.1 \pm 1.2\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, YO의 껍질은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $87.3 \pm 11.5\%$, $68.2 \pm 3.1\%$, $58.5 \pm 0.8\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 연산오계 껍질의 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는($^{***} : p < 0.001$) 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

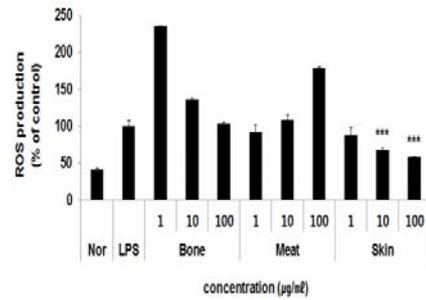


Fig. 2. Effect of various extracts of YO on the Reactive oxygen species production by RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D(Significance of results, $^{***} : p < 0.001$).

3. 세포 내 NO 생성에 미치는 영향

대조군을 $100.0 \pm 1.2\%$ 로 나타냈을 때 YO의 뼈는 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $72.8 \pm 2.4\%$, $84.3 \pm 1.1\%$, $94.1 \pm 2.3\%$ 의 생성을 나타내었으며, YO의 살은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $110.0 \pm 1.0\%$, $110.4 \pm 2.2\%$, $76.6 \pm 3.5\%$ 의 생성을 나타내었다. 또한, YO의 껍질은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $92.0 \pm 1.5\%$, $96.0 \pm 2.0\%$, $85.3 \pm 4.8\%$ 의 세포 생존율을 나타내어 연산오계 뼈의 1, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도와 연산오계 살의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의성 있는($^{***} : p < 0.001$, $^{**} : p < 0.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 3).

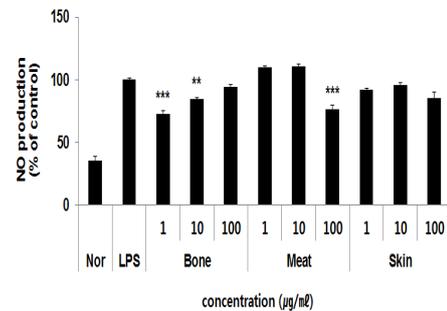


Fig. 3. Effect of various extracts of YO on the nitric oxide production by RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean \pm S.D(Significance of results, $^{***} : p < 0.001$, $^{**} : p < 0.01$).

4. 세포 내 cytokine에 미치는 영향

1) 항염증 효능

IL-6는 대조군을 $14114.3 \pm 2455.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때, YO의 뼈는 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $13799.9 \pm 1256.4 \text{ pg}/\text{ml}$, $12274.9 \pm 457.1 \text{ pg}/\text{ml}$, $11914.8 \pm 1952.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었으며, YO의 살은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $12152.6 \pm 2519.6 \text{ pg}/\text{ml}$, $13503.3 \pm 1887.6 \text{ pg}/\text{ml}$, $14007.2 \pm 357.4 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성을 나타내었다. 또한, YO의 껍질은 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 $7564.1 \pm 1988.5 \text{ pg}/\text{ml}$, $7203.0 \pm 1642.0 \text{ pg}/\text{ml}$, $8798.3 \pm 2095.6 \text{ pg}/\text{ml}$ 의 생성량을 나타내어 연산오계 껍질의 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있는($^{*} : p < 0.01$, $^{*} : p < 0.05$) 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

TNF- α 는 대조군을 $7925.7 \pm 576.8 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타냈을 때, YO의 뼈는 1, 10, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 6973.1 ± 482.2

pg/ml, 6779.8 ± 257.1 pg/ml, 6762.4 ± 402.9 pg/ml의 생성을 나타내었으며, YO의 삶은 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 5683.9 ± 579.4 pg/ml, 5479.6 ± 777.6 pg/ml, 6143.3 ± 251.8 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, YO의 껍질은 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 7895.3 ± 677.1 pg/ml, 7372.6 ± 1183.7 pg/ml, 7655.0 ± 351.9 pg/ml의 생성량을 나타내어 연산오계 살의 1, 10 (ug/ml) 농도에서 유의성 있는(* : p < 0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

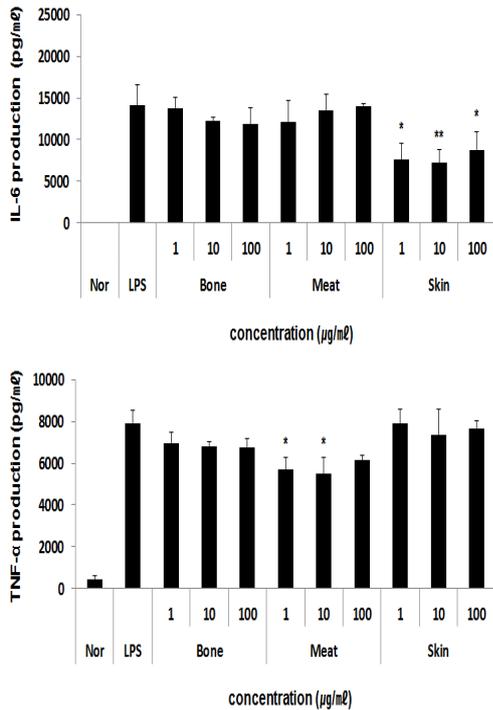


Fig. 4. Effect of various extracts of YO on the cytokines production by RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean ± S.D(Significance of results, ** : p < 0.01, * : p < 0.05).

2) 면역증진 효능

IL-6는 정상군을 13.2 ± 1.1 pg/ml로 나타냈을 때, YO의 뼈는 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 13.1 ± 2.2 pg/ml, 17.5 ± 1.1 pg/ml, 17.0 ± 1.2 pg/ml의 생성을 나타내었으며, YO의 삶은 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 15.2 ± 0.3 pg/ml, 50.5 ± 0.8 pg/ml, 71.5 ± 0.3 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, YO의 껍질은 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 16.5 ± 2.5 pg/ml, 18.3 ± 0.8 pg/ml, 18.1 ± 0.6 pg/ml의 생성량을 나타내었다(Fig. 5).

TNF-α는 정상군을 1081.9 ± 37.0 pg/ml로 나타냈을 때, YO의 뼈는 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 1033.1 ± 5.4 pg/ml, 1199.1 ± 144.0 pg/ml, 1069.5 ± 22.7 pg/ml의 생성을 나타내었으며, YO의 삶은 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 1223.8 ± 31.5 pg/ml, 1372.6 ± 18.4 pg/ml, 1555.6 ± 216.8 pg/ml의 생성을 나타내었다. 또한, YO의 껍질은 1, 10, 100 (ug/ml) 농도에서 1111.6 ± 106.3 pg/ml, 1158.3 ± 7.1 pg/ml, 1340.4 ± 179.6 pg/ml의 생성량을 나타내었다(Fig. 5).

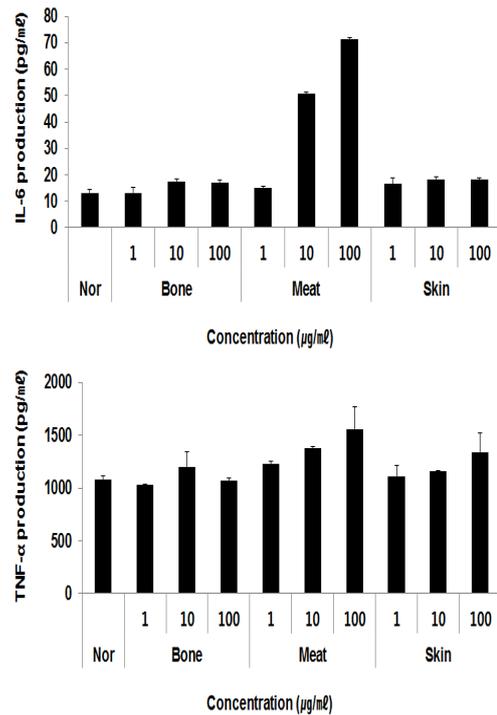


Fig. 5. Effect of various extracts of YO on the cytokines production by RAW 264.7 cells. The results were expressed as mean ± S.D.

고찰

연산 화약리의 오계 (連山 花岳리의 烏鷄, 이하 연산오계) 라는 명칭으로 천연기념물 제265호에 지정되어 있는 연산오계는 외형뿐만 아니라 뼈까지 검은 우리나라의 전형적인 재래 닭으로써 털은 흰 반면 뼈가 검은 일본의 천연기념물인 오골계와는 차이가 있다. 동의보감 금수편에는 "骨必黑, 乃眞烏鷄也"라 하여 오계와 오골계의 차이를 뒷받침 해주고 있다³⁾.

《東醫寶鑑》에 수재된 烏鷄의 효능을 보면 補虛羸, 安胎 등 일종의 補劑에 해당되는 치료법과 더불어 癰疽, 寒濕痺, 折傷, 中風 등의 다양한 증상을 치료하는 治療劑로서 兩價 효능을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 이들의 구체적인 효능을 평가하기 앞서 이러한 질환의 공통적인 병리적 인자로 인식되고 있는 항산화, 항염증, 면역조절 작용 등 다양한 생리활성을 검토하고자 하였다.

본 연구에 사용된 RAW 264.7 세포는 대식세포로서 생체 방어에 중요한 역할을 하는 염증과 면역 담당으로서의 기능을 가진 세포이다.

우선, 세포독성 평가를 실시한 결과, YO는 모든 부위와 농도에서 100% 이상의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 확인되었다.

대식세포는 외부에서 이물질이나 바이러스, 병원 미생물 등이 침입할 경우, 생체 방어를 보다 효과적으로 수행하기 위해 반응성이 높은 독성 물질인 활성산소(ROS)를 생산하게 된다. 즉, 활성산소의 제 1의 기능은 살균작용과 세포 상해작용이라 할 수 있다⁵⁾. 그러나 이러한 활성산소는 정상세포에 작용하면 심혈관계 질환, 암 등을 유발하고 피부 세포 및 조직 손상을 주도한다. 이들은 항산화효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 피부 항산화 방어망을 파괴함으로써 멜라닌 생성반응 축

진, DNA산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 준다⁶⁾. 이로 인해 피부에 염증을 유발시키고, 피부면역기능을 억제시켜 탄력감소, 주름살 및 기미, 주근깨 등으로 피부 노화가 가속화된다^{6,7)}. 본 연구에서 YO가 ROS 생성량에 미치는 영향을 확인한 결과, YO는 껌질의 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서는 유의성 있게 감소시켰다. 상기한 항산화 효과는 산화적 손상이 노화를 비롯하여 암, 심혈관계 질환 유발에 기본적인 병리인 자라는 점에서 오계가 항산화 식품으로써 활용될 수 있음을 시사해주고 있으며, 실제로 오계를 활용하여 다양한 건강식품들이 개발된 예는 이를 증명해주고 있다. 아울러 오계의 항산화 효능에 대한 객관적인 효능 결과는 본 연구의 목적 중 하나인 노인 허약자 및 암환자의 식이를 개발하는데 있어 기초적 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

면역 반응에 비해 면역 관용 기작이 강해질 경우 인체면역계는 암의 발생이나 외부 바이러스 병원성 균등의 침입이 용이하게 되어 암 또는 바이러스 및 세균성 질환을 발생시키게 되며, 이와 반대로 면역 반응성이 면역 관용 기능보다 강해질 경우는 자가 면역질환, 강력한 이식 거부 반응 및 알러지성 질환과 같은 염증성 질환을 초래하게 되므로 면역과 염증은 서로 상호관계에 있다고 할 수 있다⁸⁾. 특히나 염증반응은 상처와 외부 이물질의 침입 시 생체를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 선천성 면역(innate immunity) 반응이라고 알려져 있어 면역과 염증의 관계를 더욱 뒷받침 해주고 있다⁹⁾.

이러한 면역과 염증에 모두 관여하게 되는 대표적인 물질로는 일산화질소(NO)와 사이토카인(cytokine)으로 알려져 있는데¹⁰⁾, NO는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역기능 등이 있지만, 과량이 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상뿐만 아니라 염증반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용하게 된다^{11,12)}. 본 연구에서 YO가 NO 생성량에 미치는 영향을 확인한 결과, YO는 뼈의 1, 10 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 살의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 NO 생성량을 유의성 있게 감소시켰다. ROS와 NO 생성량에 대한 연구 결과를 비교해 보면 서로 상반된 결과를 나타내었는데, 이는 YO의 뼈와 살은 대식세포가 LPS를 통해 염증 반응을 일으킴에 따라 식균작용을 위해 활성산소를 많이 분비해 NO 생성량 감소에 영향을 주었으며, 껌질은 항산화제로서의 효능을 통해 암, 당뇨, 심혈관질환, 노화 등의 면역 관련 질환의 예방에 있어 효과적일 것이라 사료된다.

염증 반응에서 Interleukin(IL)-6는 친염증성 사이토카인으로, helper T세포, 대식세포, 비만세포, 중성구, 상피세포, 섬유아세포 등에서 분비되며 면역 반응에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여한다¹³⁾. 또한 감염이나 손상 등에 급성 반응을 보이며, 알레르기성 질병을 포함하여 염증성 질환을 만성적인 단계로 발달시킨다¹⁴⁾.

Tumor necrosis factor(TNF)- α 는 중요한 염증성 사이토카인으로서, 주로 활성화 된 대식세포에서 분비되지만, 섬유아세포, T세포, B세포, 내피세포 및 상피세포에서도 분비된다¹⁵⁾. 과량 생성이 되면, 급성 염증반응을 일으키고 악화시키는 인자로 작용하게 되며, 화학주성으로 염증관련 세포들의 활성화를 유도한다¹⁶⁾. 이처럼 과도하게 분비된 TNF- α 및 IL-6는 면역계 항상성의 불균형을 초래하여 다양한 세포와 조직에 기능저해를 일으켜 제 2형 당뇨, 염증성 질환, 류마티스 관절

염 등과 같은 만성염증 및 자가면역질환을 유발할 수 있다고 알려져 있어 면역에 있어 TNF- α 및 IL-6는 매우 중요하다고 할 수 있다^{14, 17-18)}. 본 연구에서 LPS로 자극한 대식세포를 가지고 항염증에 미치는 영향을 확인한 결과, 대조군에 비해 YO의 껌질은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서, YO의 살은 1, 10 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 IL-6와 TNF- α 의 항염증 효능을 유의성 있게 감소 시켰다. 전체적으로 항염증 실험과 항산화 실험 결과는 상호 연관성이 있어, 만성 염증성 질환을 앓고 있는 다양한 환자들에게 활용 가치가 높을 것으로 보인다.

면역 반응에서 IL-6는 조혈작용과 면역반응을 조절하는데 관여하며 B세포의 항체생성 세포인 plasma cell의 최종 분화를 유도하는 활성을 가진 B세포 자극 인자로 면역글로불린의 합성을 증진하고, IL-6 수용체(receptor)에 결합하여 후천성 면역과 관계된 림프구를 활성화 시키는 역할을 하며¹⁷⁻¹⁹⁾, TNF- α 는 종양괴사인자로 종양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나, 그 밖에 바이러스의 세포 내 복제를 저해하기도 하고, 대식세포를 자극하기도 하며, 염증반응을 촉진하는 등, 내재면역반응(innate immune response)에 폭넓게 관여하는 신호분자이다²⁰⁾. 더욱이 TNF- α 는 자가면역 질환의 질병에 있어 양방에서 주로 사용되는 치료제로써 이는 곧 TNF- α 가 면역에 중요한 물질임을 알 수 있다. 본 연구에서 아무것도 처리하지 않은 대식세포에 YO가 면역증진에 미치는 영향을 확인한 결과, 정상군에 비해 YO의 살은 IL-6와 TNF- α 를 증가시켰다.

위의 결과를 종합해 보면, YO는 동의보감에 기재된 내용처럼 독성이 없으며, 항산화 및 항염증, 면역증진을 통해 心病, 肚病, 癱瘓, 補虛羸, 安胎, 折傷, 癰疽 등에 효능이 있다고 사료된다. 추후 위와 같은 증상에 대한 심도있는 기전 연구 등이 가미된다면 연산오계의 활용가치가 더욱 높아질 것이라 기대된다.

결론

본 연구에서는 연산오계 수탁을 각 부위별로 나누어 다양한 효능을 객관적으로 검증하기 위하여, 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 독성 및 항산화, 항염증 및 면역증진에 대한 연구를 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군에 비해 YO의 모든 부위는 100% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.
2. 대조군에 비해 YO는 뼈의 1, 10 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 살의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 활성산소 생성을 증가시켰으며, 껌질의 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서는 유의성 있게 감소시켰다.
3. 대조군에 비해 YO는 뼈의 1, 10 ($\mu\text{g/ml}$) 농도와 살의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 일산화질소 생성량을 유의성 있게 감소 시켰다.
4. 대조군에 비해 YO의 껌질은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서, YO의 살은 1, 10 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 IL-6

와 TNF- α 의 항염증 효능을 유의성 있게 감소 시켰다.

5. 정상군에 비해 YO의 살은 IL-6와 TNF- α 에서 면역 증진 효능을 증가시켰다.

이상의 결과들로 보아 세포독성, 항산화, 항염증 및 면역증진 연구를 통한 유의적인 결과는 신규 치료제 및 관련 제품 개발에 기초적 자료를 제공할 수 있을 것으로 보이며, 한의학 적 관점에서는 객관적 규명을 통한 EBM 구축에 일조할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발 사업(314040-03-1-HD030)에 의해 이루어진 것임.

References

1. Oh JH. HF-IFF: Applying TF-IDF to Measure Symptom-Medicinal Herb Relevancy and Visualize Medicinal Herb Characteristics -Studying Formulations in Cheongkangeuigam-. Kor J Herbol. 2015 ; 30(3) : 63-8.
2. Cultural Heritage Administration, Natural heritage Division. http://www.cha.go.kr/korea/heritage/search/Culresult_Db_View.jsp?mc=NS_04_03_01&VdkVgwKey=16,02650000,34.
3. Heo J. DongEuiBoGam, Seoul : BubInBooks, 2007 : 1065, 1858-9.
4. Chae HS, Ahn CN, Yoo YM, Ham JS, Lee JM, Yoon SK, Choi YI. The Effects of the High Pressure Boiled Extracts (HPBE) of the Ogol Chicken with Herbs on the Hormones, Cytokine, Specific Antibody of Serum in the Rat. Korean J Food Sci Anim Res. 2004 ; 24(3) : 283-92.
5. Choi BK, Jung SY, Park KS, Jo JH. Reactive Oxygen Substances and Diseases, Seoul : SinllBooks, 2004 : 34-7.
6. Jung HS, Song YS, No KH, Jo YH, Park JY, Choi CY, Kwon TY. Effect of buchu (*Allium tuberosum*) on lipid peroxidation and antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats. J Life Sci. 2003 ; 13(3) : 333-42.
7. Park SM. Effect of Natural Products on Skin Cells -Action and Suppression of Reactive Oxygen Species-. Soc Cosmet Sci Korea. 1999 ; 32(10) : 77-127.
8. Kwon HG, Hwang JS, So JS, Lim SH. Immunological homeostasis and inflammatory immune disorders. Korean Soc Mol Cell Biol. 2008 ; 20(1) : 48-69.
9. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. Clin Exp Immunol. 2007 ; 147(2) : 227-35.
10. Byun SH, Yang CH, Kim SC. Inhibitory effect of Scrophulariae Radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. Kor J Herbol. 2005 ; 20(2) : 7-16.
11. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2001 ; 282(5) : 1075-9.
12. Han HS. Effect of Fermented Artemisiae Argyi Folium on Human Hepatoma Cell Line HepG2 Activity. Kor J Herbol. 2013 ; 28(3) : 107-13.
13. Tak MJ, Tak MR, Kang KH, Ko WS, Yoon HJ. The Inhibitory Effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2010 ; 23(1) : 118-34.
14. Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res Ther. 2006 ; 8 : S3.
15. Kwak CS, Lee JH. In vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extracts from Sprout of Evening Primrose (*Oenothera lacinata*) and Gooseberry (*Actinidia arguta*). J Korean Soc Food Sci Nutr. 2014 ; 43(2) : 207-15.
16. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. Science. 1992 ; 258(5092) : 1957-9.
17. Wang X, Luo Y, Liao WB, Zhang J, Chen TM. Effect of osteoprotegerin in combination with interleukin-6 on inhibition of osteoclast differentiation. Chin J Traumatol. 2013 ; 16(5) : 277-80.
18. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008 ; 454(7203) : 428-35.
19. Jung SY, Seo HS. The Effects of Samhwangseje on Anti-Inflammation in Raw 264.7 cell. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2009 ; 22(1) : 108-19.
20. Cha JH, Kim YS, Lee EM. Effects of *Prunellae spica* water extract on immune response in macrophage cells. J Orien Obstet Gynecol 2010 ; 23(1) : 91-100.