

Hepatoprotective Effects of Sumaeyaksuk (*Artemisia argyi* H.) Extract on LPS-mediated Inflammatory Response

Dong-Gyu Kim, Min-Jung Kang and Jung-Hye Shin*

Namhae Garlic Research Institute, Namhae 668-812, Korea

Received June 27, 2016 / Revised July 27, 2016 / Accepted August 8, 2016

Artemisia, a plant widely used as traditional herbal medicine in many countries, has drawn attention of the researchers. And its extracts or compounds are known to have an efficacy of antioxidant, anti-diabete, anti-cancer, anti-inflammation and neuroprotection. Sumaeyaksuk is a variant of the *Artemisia argyi* and major constituents are eupatilin and jaceosidin. This study was performed to investigate the effects of the sumaeyaksuk aqueous extract on inflammatory response induced by lipopolysaccharide (LPS) in human hepatoma HepG2 cells. To examine the potential hepatoprotective properties of sumaeyaksuk extract, cell viability, as well as nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), interleukin-8 (IL-8) levels, alanine transaminase (ALT), and aspartate transaminase (AST) activities, were measured. Cytotoxic activity of extracts on HepG2 cells was measured by MTT assay. Sumaeyaksuk extract did not induce cytotoxicity at concentrations of 0~400 µg/mL. NO and ROS levels significantly decreased with increasing concentration of the extract. The secretion levels of M-CSF and IL-8 were suppressed by sumaeyaksuk extract in a dose-dependent manner. Moreover, ALT (75.4%) and AST (61.6%) levels significantly decreased in sumaeyaksuk extract-treated cells at 400 µg/mL. These results suggested that the sumaeyaksuk extract attenuates the LPS-induced hepatotoxicity resulting from regulation of inflammatory factors and could potentially be used as a hepatitis therapeutic agent.

Key words : ALT (alanine transaminase), AST (aspartate transaminase), cytokine, NO (nitric oxide), ROS (reactive oxygen species)

서 론

간질환은 만성간염에서 간경변증에 이르기까지 종류와 심한 정도가 다양한데, 간세포 파괴에 의한 해독능력 저하와 담즙분비 억제에 의한 독성물질 배설장애, 비타민 B₂, B₃ 및 C의 흡수 억제에 의한 전신 권태감, 소양감, 식욕부진, 피로 등의 증상을 동반하며, 간염, 알코올성 간질환, 지방간, 간경변, 간암 등의 질환이 발생하여 사망에까지 이르게 된다[16]. 간질환은 여러 가지 원인에 의해 발생되는 것이 특징이며, 특히 과도한 음주, 흡연, 약물 및 스트레스에 의한 빈도가 높다. 이러한 원인들에 의한 염증성 물질의 발생은 췌장염, 심근경색, 신경장애 등의 질환을 유발하며 이외에도 간조직의 구조 및 기능에 치명적 손상을 초래하고 있다[10, 21, 22, 36].

Lipopolysaccharide (LPS)는 인체 내 면역부위에서 항원으로 작용하는 대표적인 체내 염증 유발물질로 알려져 있다.

LPS항원은 인체 내에서 자기방어 기능으로 인하여 macrophage와 같은 항원 제시세포에 의하여 인식된다. LPS는 주로 Toll-like receptor 계열에 의하여 인식되며 cluster of differentiation-14의 결합으로 인체 내에서 방어기전을 실행시킨다[24]. LPS의 주된 특성은 패혈성 쇼크를 일으키는 것이며 혈장 속에 떠돌아다니는 LPS-binding protein (LBP)에 의하여 독성을 일으키는 첫 단계에 돌입한다[26]. 인체 내로 들어온 LPS는 LBP에 의해 복합체가 만들어지고 이것이 혈액내 macrophage의 CD-14에 결합하게 되면 TLR-4에 인식되어 결합되는 순간 nuclear factor kappa B (NFκB)가 활성화 된다[1, 34, 37]. NFκB가 활성화되면 cytokine과 chemokine 등의 물질이 과량 분비되고 내재면역반응을 유발시킨다[4]. LPS에 의한 패혈성 쇼크는 cytokine 중 tumor necrosis factor (TNF-α)를 과다 발현시켜 정상세포들의 apoptosis를 유도한다[38]. 이러한 TNF-α의 증가는 또한 neutrophil을 활성화 시키는데 일조하고 neutrophil의 증가로 인해 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 유전자가 활성화되어 nitric oxide (NO)의 생성을 증가시킨다[6]. NO는 macrophage의 활성화로 인한 산물로 oxygen radical과 더불어 강력한 항 미생물 작용을 하며 NO가 생성될 때 Ca²⁺ 농도의 증가로 인해 superoxide anion (O²⁻)과 H₂O₂가 함께 생성되면 산화력이 강한 OH⁻의 연쇄반응을 일으켜 세포 조직에 영향을 주어 직간접적으로 조직의 산화를 초래한다

*Corresponding author

Tel : +82-55-860-8947, Fax : +82-55-860-8960

E-mail : whanbee@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

[9].

국화과의 여러해살이 식물인 쑥(*mugwort, Artemisia*)은 약쑥, 발쑥, 사재, 모기태쑥이라고도 불리는데 아시아 지역뿐만 아니라 유럽 등 전 세계에서 약 2,000여종이 자생하며 우리나라에는 참쑥, 황해쑥, 사철쑥, 더위지기, 맑은대쑥 등 약 300여종이 자생한다고 알려져 있다[14]. 쑥은 한방에서 지혈, 소화, 하복부 진통, 약취 제거, 위장병, 변비에 효과가 있다고 밝혀져 있으며[31], 섬유소가 풍부한 알칼리성 식품으로 체질을 개선하고 고혈압, 동맥경화 예방에 효과가 있어 특히 중년 여성의 비만에 좋은 것으로 보고되어 있다[19]. 쑥은 독특한 맛과 향으로 인해 여러 가지 식품 재료로도 많이 이용되어 왔는데, 쑥의 주요 성분으로는 alkaloid류, 비타민류, 정유류, 무기질 등이 알려져 있다[28], 쑥의 생리활성에 관해서는 쑥가루 추출물 급이 시 체중감소 경향이 보인다는 보고[17]와 흰쥐에 쑥분말을 8% 이상 첨가하여 급이 시 성장률이 차츰 증가하였다는 보고[11]가 있으며, 폐놀성 물질의 항산화 효과[18]와 항암 활성[28] 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 황해쑥의 일종인 섬애약쑥의 기능성 규명 및 간기능 개선 식품소재 개발을 위한 기초 연구의 일환으로 섬애약쑥 열수 추출액을 대상으로 간 기능 개선 활성을 확인하고자 하였다. 이를 위해 우선 항염증 활성지표를 확인하였으며 다음으로 간 독성 지표를 인간 간세포주인 HepG2 세포에서 검증하였다.

재료 및 방법

섬애약쑥 추출물 제조

섬애약쑥은 경남 남해군에서 재배된 것을 4월에 수확하여 사용하였다. 쑥은 잎의 끝에서부터 줄기를 따라 20 cm 정도에서 절단한 상부를 채취하였으며 흐르는 물에서 2회 세척한 후 동결건조하여 추출에 사용하였다. 추출물의 제조를 위해 동결건조된 원물은 중량 100 g당 물 1 l를 첨가한 후 70°C에서 6시간 진탕추출하였고, 여액은 수거하여 동결건조를 통해 최종 건조물을 얻었으며 -70°C에 보관하면서 적정 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

HepG2 간암 세포 증식에 대한 섬애약쑥의 cytotoxicity 측정

인간 간암 세포인 HepG2 세포는 10%(v/v) fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml, streptomycin (100 µg/ml)을 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂로 유지하면서 배양하였다. LPS를 통한 간세포 독성 유도 실험을 실시하기 전에 추출물의 독성을 확인하고자 HepG2 세포에서 cytotoxicity test를 수행하였다. 96 well plate에 세포농도 2.5×10⁵ cells/ml로 분주한 다음 세포부착을 위해 24시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 세포의 cytotoxicity를 확인하였다.

시료의 cytotoxicity는 cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan)을 이용하여 측정하였다.

HepG2 간암 세포에서 NO 생성 억제 활성평가

세포로부터 생성되는 NO의 양은 Giustarini 등(2008)의 방법[8]을 응용하여, 세포배양액 중에 존재하는 NO²를 그리스 시약(griess reagent)으로 측정하였다. 그리스 시약(0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 추정하기 위해 NO 생성정도를 비교하였다. 다양한 농도의 시료(100, 150, 200, 400 µg/ml)를 각 well에 처리한 다음, 30분 후에 LPS 1 µg/ml를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 세포 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액 중 100 µl를 취해 그리스 시약 100 µl와 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Epoch, Biotech, Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성 억제 활성은 LPS 단독 처리군 대비 시료 처리군의 NO 생성량을 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

DCFH-DA에 의한 intracellular ROS 측정

Intracellular ROS 측정은 intracellular ROS assay kit (Cell Biolabs, Arions, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 96 well black plate에 5×10⁴ cell/well의 HepG2 cell을 black plate에 분주한 후 배양하여 세포를 well에 부착시켜 serum free DMEM 배지로 교환하였다. 세포를 24시간 배양한 후 각 시료를 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. PBS (pH 7.4)로 3회 세척한 다음 1X dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)를 배지에 100 µl 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 1시간 배양한 후 또 다시 PBS로 3회 씻어냈다. Lysis buffer 100 µl를 첨가하여 혼합한 후 fluorescence microplate reader (VICTOR3™ Multilabel Plate Reader, PerkinElmer life and analytical sciences, Shelton, CT, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광을 측정하여 LPS 단독 처리군과 시료 처리군에 대한 ROS 생성을 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

Cytokines (M-CSF, IL-8) 생성 측정

HepG2 cells을 24 well plate에 5×10⁵ cell/well이 되도록 분주하고, 부착시킨 후 FBS를 뺀 DMEM 배지로 18시간 배양하였다. 섬애약쑥 추출물을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1시간 배양한 후 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 다시 18시간 배양한 다음 세포 배양액을 수거하여 실험 전까지 -70°C에 보관하였다.

M-CSF와 IL-8의 생성양은 Enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA) kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. Anti-mouse M-CSF와 IL-8로 pre-coating된 96 well plate에 각각 배양액 50 μ l 혹은 standard reagent를 넣은 후 biotinylated antibody reagent 50 μ l씩을 첨가하여 2시간 반응시켰다. Washing buffer로 5회 세척한 후, 희석된 streptavidin-HRP concentrate를 100 μ l 첨가하여 30분간 반응 시킨 다음 plate를 세척하였다. 여기에 TMB substrate 100 μ l를 첨가하여, 빛을 차단한 조건 하에서 30분 간 반응 시킨 후 stop solution 100 μ l를 처리하고 microplate reader (Epoch)를 이용하여 450 nm에서 측정한 흡광도 값을 550 nm 값으로 보정하였다.

ALT와 AST 활성 측정

LPS 처리를 통한 간세포 독성 유도 실험과 같은 방법으로 시료를 처리한 후 배양액을 취해 배양액 중에 유리된 alanine transaminase (ALT) 및 aspartate transaminase (AST) 효소의 활성을 측정하였다. ALT와 AST의 활성은 ALT, AST 측정용 시액(Asan pharmaceutical Co., Seoul, Korea)을 구입하여 사용하였다. ALT 및 AST 활성은 기질액인 L-aspartic acid 및 DL-alanine 1 ml에 배양액 0.2 ml를 가해 잘 혼합한 후 37°C에서 AST는 60분, ALT는 30분간 항온하였다. 정색시약 1 ml를 가하고 잘 혼합하여 실온에서 20분간 보관한 후 0.4 N NaOH를 10 ml 첨가하여 10분간 정치하고 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. AST 활성은 표준곡선을 이용하여 Karmen unit으로 나타내었다. ALT와 AST의 활성 비교를 위하여 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 활성을 비교하여 백분율로 나타내었다.

통계처리

데이터는 3회이상 반복실험한 결과를 평균±표준편차로 표현하였으며, 데이터의 통계처리는 Statistical Package for Social Science (Version 10, SPSS, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석하였다. Student's t-test 방법에 의하여 각각의 실험군과 대조군간의 유의성 차이를 검증하였다(* p <0.05, ** p <0.01, 그리고 *** p <0.001).

결과 및 고찰

HepG2 간암 세포 증식에 대한 세포독성 평가

LPS는 그람음성균의 세포벽에 존재하는 구성물질의 일종으로 감염이나 염증을 유발하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 유전자를 활성화 시켜 nitric oxide (NO)의 생성을 증가시킨다[34]. 또한 흰쥐의 간조직과 간세포에서 iNOS를 전자전달계에서 유도하고[23], iNOS에 의해 대량생산된 NO는 자가면역 조직 독성의 병리에서 중요한 역할을 하며 혈관이완에 의한 패혈성 쇼크(septic shock) 및 간조직이나 간

세포의 독성에 관여한다[2].

따라서 섬애약쭉 추출물이 간세포에 미치는 영향을 확인하고자 LPS로 염증이 유도된 HepG2 세포에서 효능을 검토하였다. LPS 처리한 HepG2 세포에 대한 섬애약쭉 물 추출물 처리에 의한 세포생존율을 평가한 결과 섬애약쭉은 400 μ g/ml 농도까지 무처리 대조군에 비해 유의한 생존율의 감소가 확인되지 않았다(Fig. 1).

황해쭉(*Artemisia argyi*) 물분획물(5 μ g/ml)은 L1210 백혈구 세포에서 95%의 세포독성을 유발하며, 항산화효소 활성변화에도 영향을 미친다는 보고가 있고[15], 또한 열수 및 메탄올 추출물(48 μ g/ml, 50.9 μ g/ml)은 H9 암세포주에 50%의 세포독성 발생시키고, CuZnSOD와 MnSOD 활성을 증가시킨다는 보고가 있다[26]. 앞선 연구 결과들에서는 쭉이 높은 독성을 가지고 있는 것으로 확인된 반면 본 실험에 사용한 섬애약쭉 추출물은 상대적으로 높은 농도에서도 세포독성이 유발되지 않았기 때문에 *in vitro*나 *in vivo* 실험에 폭넓게 사용이 가능할 것이다.

HepG2 간암 세포의 NO 생성에 대한 억제 활성평가

LPS에 의해 염증반응이 활성화되면 세포는 NO라는 염증성 chemokine이나 cytokine의 발현에 변화를 일으켜 일련의 반응을 거쳐 최종적으로 염증을 유발한다[38]. 세포 내 염증유발인자의 자극으로 iNOS 및 COX-2의 발현이 증가하면 이는 염증인자인 NO의 생성을 유발하며 생성된 NO는 신경독성, 신초전달 및 체내방어 등의 생리적 기능을 수행하고, 또한 암의 유발과 관련하여 병리적으로 중요한 작용을 한다[3]. 염증반응 부위에서 NO의 과다발현은 많은 염증과 자가 면역 질환

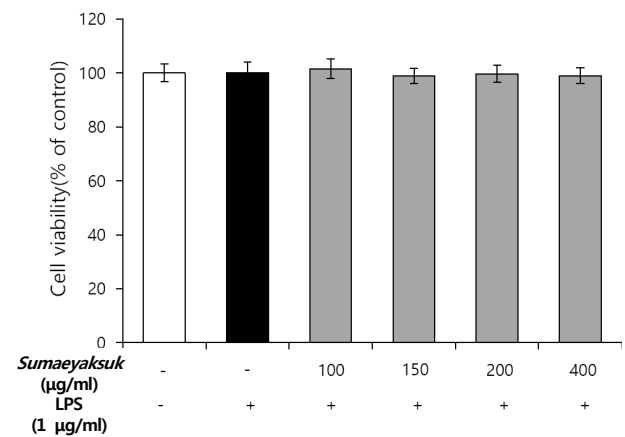


Fig. 1. Effect of *sumaeyaksuk* extract on cell viability by HepG2 cells. HepG2 cells were treated with *sumaeyaksuk* extract in the presence or absence of LPS (1 μ g/ml). After 24 hr MTT assay was conducted. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3). No significant alteration of cell viability was observed in *sumaeyaksuk* extract treatment (p <0.05).

의 매개물질로 작용한다는 것은 잘 알려져 있다[8]. 그래서 각 추출물들의 NO 생성 억제효과를 LPS 처리한 간암 세포주에서 실험하였다.

앞선 세포독성 결과에서 섬애약쑥의 경우 400 µg/ml 농도까지 세포독성이 없는 것으로 확인되었기 때문에 100, 150, 300, 400 µg/ml의 농도에서 NO 생성 억제 효과를 측정하였다. 섬애약쑥 추출물은 실험된 모든 농도에서 LPS 단독 처리군에 비해 NO 생성량이 유의적으로 감소하였으며 농도의존적인 NO 생성량 감소를 나타내었다. 가장 낮은 농도인 100 µg/ml에서도 40% 정도의 NO 생성억제 활성을 나타내어 높은 NO 생성억제 효율을 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

HepG2 간암 세포에서 ROS 생성에 대한 억제 활성평가

Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 세포막을 통해 확산되며 세포 내 esterase에 의해 효소적으로 가수분해 되어 비형광성 DCF-H가 되며, 세포 내 ROS가 존재할 경우 매우 빠르게 높은 형광을 띤 DCF로 산화된다[20]. DCFH-DA를 이용하여 세포 내 ROS 생성량을 측정함으로써 섬애약쑥 추출물의 산화적 스트레스를 저하시키는 효과를 확인하였다(Fig. 3). HepG2 세포의 ROS 생성을 확인하였을 때, LPS를 처리하지 않은 세포군에서는 DCF-DA로 염색된 세포가 적었고, LPS로 자극한 세포는 DCF로 염색된 세포가 많은 것으로 보아 세포 내의 ROS 생성이 활발한 것을 알 수 있었다. 섬애약쑥 추출물을 100, 150, 200, 400 µg/ml의 농도를 세포에 전처리하고 30분 후 LPS로 자극한 세포의 ROS 생성량을 fluorescence microplate reader를 이용하여 조사해본 결과, LPS를 단독으로 처리한 대조군에 비해 섬애약쑥 추출물 처리군에서 유의적으로 ROS 생성량을 감소시켰다($p < 0.001$). 특히 400 µg/ml 농도의

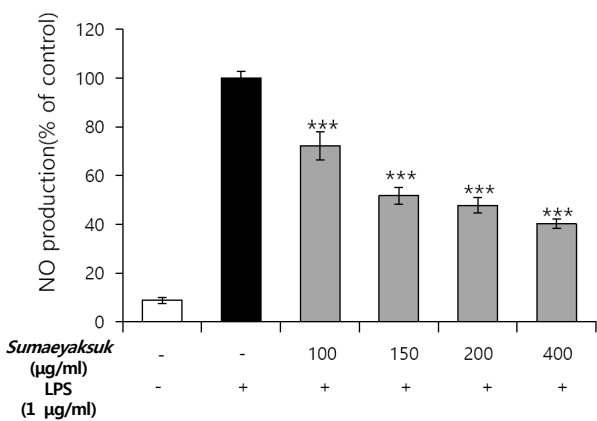


Fig. 2. Effect of *sumaeyaksuk* extract on the production of NO by HepG2 cells. HepG2 cells were treated with *sumaeyaksuk* extract in the presence of LPS (1 µg/ml). After 24 hr NO levels were determined by Griess assay. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); *** $p < 0.001$ compared with only LPS treated group.

섬애약쑥 추출물 처리시에는 LPS에 의해 산화적 스트레스를 유발하지 않은 무처리 대조군과 유사한 정도의 ROS 생성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3).

염증성 cytokine 분비억제 효능 검증

앞선 실험결과들을 통해 섬애약쑥 추출물이 항염증 효과가 있음을 확인하였고, 이후 HepG2 세포에 어떤 cytokine을 조절하여 항염증 반응을 유도하는지 알아보기 위해 염증성 cytokine의 분비를 측정하였다. 인체를 대상으로 한 Huang 등[12]의 연구에 의하면 혈청 IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α가 급성 C형 간염이나 만성 C형 간염 환자보다 간경화 및 간암 환자에서 더 높은 수준으로 유의적 증가를 보여 이들 지표가 간의 염증보다는 간경화 및 간암 등과 같은 간기능 손상과 더 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 반면 Zimmerman 등[39]은 알코올 및 C형 간염바이러스로 인한 간질환이 있는 사람의 혈청에서 IL-8이 고농도로 검출되었으며, 이는 간의 염증에 의한 것이라고 보고하였다. 다른 연구결과에서도 C형 간염 바이러스에 의한 간질환 환자에서 혈청 IL-8 수준이 증가하여 IL-8과 간염이 밀접한 관련이 있음을 확인하였다[5]. 또한 M-CSF은 염증 반응 시 분비가 촉진되는 cytokine으로, 급성 및 만성 간염이 있는 사람에서 M-CSF의 농도가 유의적으로 증가한다는 보고가 있으며[13], HepG2 세포에서도 내생적 (endogenous)으로 발현되는 cytokine으로 알려져 있다[28, 33]. 따라서 기존의 연구 결과를 토대로 볼 때 간염 환자에서 유의적으로 발현이 증가된 cytokine인 IL-8과 M-CSF가 HepG2 세포에서도 내생적으로 발현되기 때문에 이들은 적절한 *in vitro* 염증반응지표로 사료되어 본 실험에 적용하였다. 섬애약쑥 물 추출물에 의한 HepG2 세포의 IL-8의 분비량을

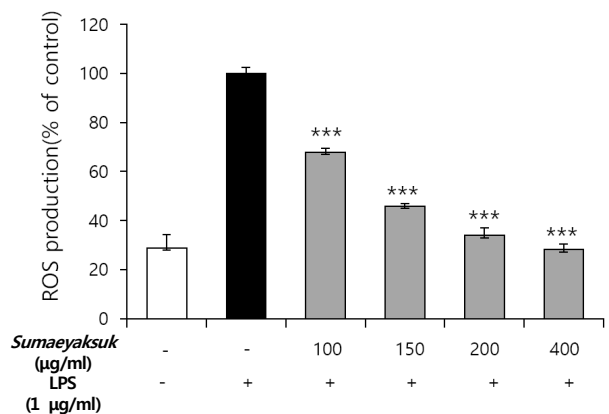


Fig. 3. Effect of *sumaeyaksuk* extract on the production of ROS by HepG2 cells. HepG2 cells were treated with *sumaeyaksuk* extract in the presence of LPS (1 µg/ml). After 24 hr ROS levels were determined by intracellular ROS assay kit. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); *** $p < 0.001$ compared with only LPS treated group.

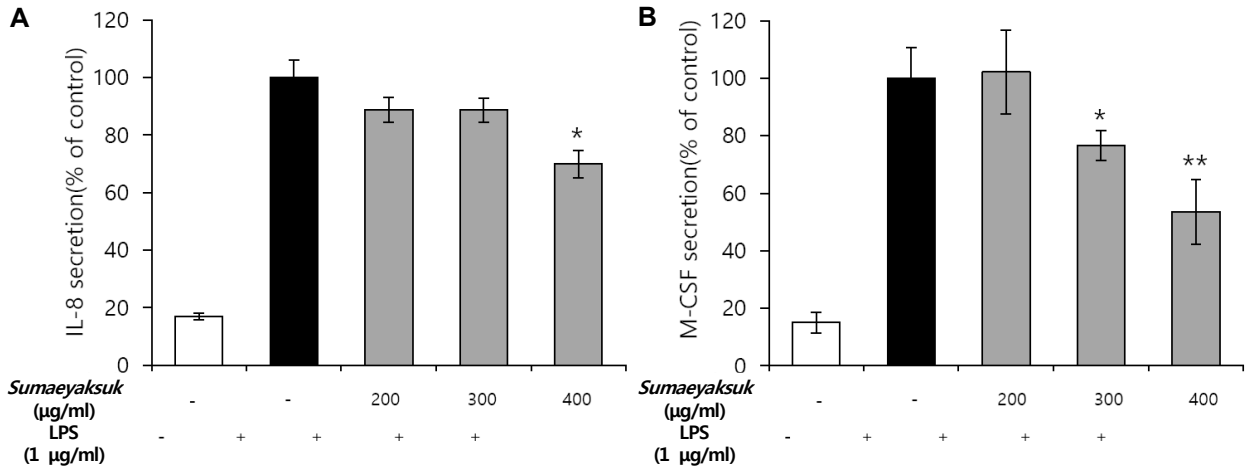


Fig. 4. Effect of *sumaeyaksuk* extract on IL-8 (A) and M-CSF (B) secretion by HepG2 cells. HepG2 cells were treated with *sumaeyaksuk* extract in the presence of LPS (1 µg/ml). After 24 hr IL-8 and M-CSF secretion were investigated. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); **p<0.01 *p<0.05 compared with only LPS treated group.

측정하고, 이를 LPS 단독 처리 대조군에 대한 %비율로 나타내었다(Fig. 4A). 그 결과 쑥 추출물은 400 µg/ml의 농도에서 약 20%까지 IL-8의 분비를 유의적으로 감소시켰다(p<0.05).

또 다른 염증성 cytokine인 M-CSF의 분비량을 측정할 결과(Fig. 4B), 400 µg/ml의 쑥 추출물은 30%까지 M-CSF의 분비를 유의적으로 감소시켰다(p<0.05). 이러한 염증성 cytokine 분비량 측정결과는 쑥 추출물이 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도에서 간염과 밀접한 관련이 있는 cytokine (IL-8, M-CSF)의 발현 조절을 보여주었으므로 이후 간염 치료를 위한 단서를 제시할 것으로 기대된다.

혈청 중 AST와 ALT 활성 변화

간 조직의 손상은 간소엽 중심부의 괴사를 관찰하거나 세포에서 유리되는 특정 효소의 유출을 측정함으로써 확인할 수 있는데 세포 내에서 유리되는 효소 중AST와 ALT는 간 손상을 나타내는 대표적인 지표로써 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 아미노기 전이효소가 혈중으로 유리되어 높게 나타나는 것으로 알려져 있으므로[7] 본 실험에서 간세포의 변성 및 괴사의 지표물질로 사용하였다. AST는 glutamate의 amino기를 oxaloacetate로 전이시켜주는 enzyme으로 amino기가 전이되면 glutamate는 α-ketoglutarate가 되고 oxaloacetate는 aspartate가 된다. ALT는 glutamate의 amino기를 alanine으로 전이시켜주는 enzyme로 amino기가 전이되면 glutamate는 α-ketoglutarate가 되고 alanine은 pyruvate가 된다[23].

Fig. 5에 나타난 바와 같이 ALT의 경우 LPS 단독처리 대조군은 LPS의 간 장애 유발 활성으로 인하여 정상군에 비해 약 2.7배 증가하였으나 첨약쑥 추출물을 처리함에 따라 유의적으로 그 활성이 감소하였다. 가장 감소 활성이 높았던 첨약쑥 추출물 400 µg/ml 처리군은 대조군과 비교하였을 때 AST 생성이 61.6% 감소하였다. ALT의 활성도 LPS를 투여한 대조군이 정상군에 비해 약 2.6배 정도 증가하였고, 쑥추출물 400 µg/ml 처리군은 LPS 단독 대조군에 비해 75.4% 감소하였다. 이상의 결과로부터 쑥 추출물은 염증성 cytokine의 조절을 통해 ALT와 AST 생성을 억제함으로써 간보호작용을 나타낼 것으로 추정된다.

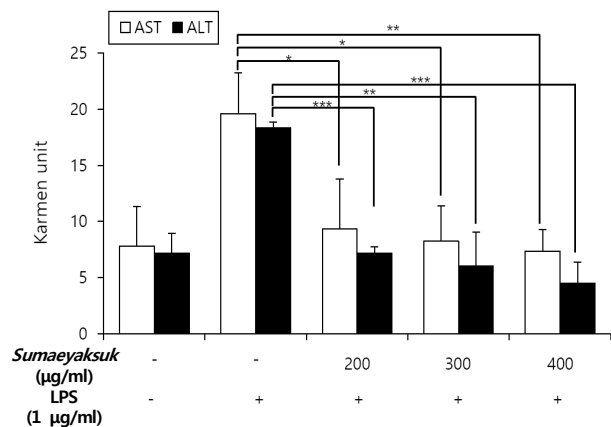


Fig. 5. Effect of *sumaeyaksuk* extract on AST, ALT level by HepG2 cells. HepG2 cells were treated with *sumaeyaksuk* extract in the presence of LPS (1 µg/ml). After 24 hr, serum levels of ALT and AST were determined. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 compared with control group.

References

1. Akashi, S., Nagai, Y., Ogata, H., Oikawa, M., Fukase, K. and Kusumoto, S. 2001. Human MD-2 confers on mouse

- Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int. Immunol.* **13**, 1595-1599.
2. Billiar, T. R., Curran, R. D., Stuehr, D. J., Ferrari, F. K. and Simmons, R. L. 1989. Evidence that the activation of kupffer cells results in the production of L-arginine metabolites that release cell-associated iron and inhibit hepatocyte proin synthesis. *Surgery* **106**, 364-368.
 3. Choi, M. W. and Kim, J. I. 2013. Anti-inflammatory effect of ethyl acetate fraction isolated from *undaria pinnatifida* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 Cells. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**, 384-392.
 4. Chung, K. F. 2006. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug Targets* **7**, 675-681.
 5. Elewa, H., Abd-Elmeneem, M., Hashem, A. M. and Alshehaby, A. 2010. Study of interleukin-8 (IL-8) serum level in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus (HCV) with and without hepato cellular carcinoma (HCC). *Int. J. Hepatol.* **1**, 9-17.
 6. Fonseca, S. G., Romão, P. R., Figueiredo, F., Morais, R. H., Lima, H. C., Ferreira, S. H. and Cunha, F. Q. 2003. TNF- α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2297-2306.
 7. Gabriel, L. P. and William, R. H. and Hayes, A. W. 1982. Principles and Methods of Toxicology. *Raben. Press.* 407-445.
 8. Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A. and Dalle-Donne, I. 2008. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol.* **440**, 361-380.
 9. Halliwell, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free. Radic. Res. Commun.* **9**, 1-13.
 10. Han, E. K., Jin, Y. X., Yoo, Y. S., Jung, E. J., Lee, J. Y. and Chung, C. K. 2009. Effect of *Artemisia capillaris* and *Paecilomyces japonica* on the reduction of hepatotoxicity and lipid metabolism induced by ethanol. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1016-1023.
 11. Haw, I. W., Lee, S. D. and Hwang, W. I. 1985. A study on the nutritional effects in rats by feeding basal diet supplemented with mugwort powder. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **14**, 123-130.
 12. Huang, Y. S., Hwang, S. J., Chan, C. Y., Wu, J. C., Chao, Y., Chang, F. Y. and Lee, S. D. 1999. Serum levels of cytokines in hepatitis C related liver disease: a longitudinal study. *Zhonghua. Yi Xue Za. Zhi.* **62**, 327-333.
 13. Itoh, Y., Okanoue, T., Enjyo, F., Sakamoto, S., Ohmoto, Y., Hirai, Y., Kagawa, K. and Kashima, K. 1994. Serum levels of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in liver disease. *J. Hepatol.* **21**, 527-535.
 14. Joung, H. S. 1993. A study on the sensory of *Ssooksulgis* added with mugworts. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **2**, 175-180.
 15. Jung, D. Y. and Park, S. W. 2002. Cytotoxicity of water fraction of *Artemisia argyi* against L1210 cells and antioxidant enzyme activities. *J. Pharm. Soc. Korea* **46**, 39-46.
 16. Kim, O. K. 2001. Protective effects of extracts of *Diospyros kaki* folium against hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 97-101.
 17. Kim, M. H., Lee, S. D. and Ryu, C. K. 1985. A study on the nutritional effects of boiling water extracts of mugwort powder in rats. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **14**, 131-136.
 18. Lee, G. D., Kim, J. S., Bae, J. O. and Yoon, H. S. 1992. Antioxidative effectiveness of water extract and ether extract in worm-wood (*Artemisia montana Pampan*). *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**, 17-22.
 19. Lee, H. J. 2010. Evaluation of the quality characteristics of sponge cake containing mugwort powder. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **20**, 95-102.
 20. Lee, Y. H., Ho, J. N., Dong, M. S., Park, J. H., Kim, H. K., Hong, B. S., Shin, D. H. and Cho, H. Y. 2005. Transfected HepG2 cells for evaluation of catechin effects on alcohol-induced CYP2E1 cytotoxicity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 1310-1316.
 21. Lieber, C. S. 1995. Medical disorders of alcoholism. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1058-1065.
 22. Lieber, C. S. 2004. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the microsomal ethanol oxidizing system. *J. Hepatol.* **40**, 198-202.
 23. McPhalen, C. A., Vincent, M. G. and Jansonius, J. N. 1992. X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aspartate aminotransferase. *J. Mol. Biol.* **225**, 495-517.
 24. Mitchell, J. A., Kohlhaas, K. L. and Sorrentino, R. 1993. Induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat mesentery: lack of effect on action of vasoconstrictors. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 265-270.
 25. Morrison, D. C. and Ulevitch, R. J. 1978. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am. J. Pathol.* **93**, 526-617.
 26. Park, W. S. and Kim, D. H. 2008. Effect of mixture of fermented *Artemisiae Argi Folium* and fermented sophorae radix on hydrogen peroxide production within mouse macrophage raw 264.7 with EtOH and nicotine. *Kor. J. Ori. Physiol. Pathol.* **22**, 1293-1298.
 27. Rhee, K. J., Kim, H. C. and Jung, B. D. 2012. Effect of *Ginkgo biloba* extract on the survival rate in lipopolysaccharide-induced sepsis model mice. *Kor. J. Vet. Serv.* **35**, 191-195.
 28. Russwurm, S., Stonans, I., Stonane, E., Weigand, G., Wiederhold, M., Jäger, L. and Reinhart, K. 1998. HepG2 hepatocytes express IFN- γ , TNF- α , TGF- β , M-CSF, oncostatin-M, ICAM-1, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 and IL-6 receptor genes *in vitro*. *Crit. Care.* **2**, 5-15.
 29. Ryakhovskaya, T. V., Ushbaeva, G. G. and Zhemaletdinov, F. G. 1989. The antitumor activity of phenol compounds from some *Artemisia spp.* *L. Rastit. Resur.* **25**, 249-253.
 30. Shim, Y. J., Paik, J. E. and Chun, H. J. 1991. A study on the texture characteristics of *Ssooksulgis* affected by mugworts. *Kor. J. Soc. Food Sci.* **7**, 35-43.
 31. Shimamura, M. and Mieda, Y. 1993. Changes in free and bound alcohol metabolites in the urine during ethanol oxidation. *Arukoru. Kenkyuto. Yakubutsu Ison.* **28**, 441-452.
 32. Sim, Y. J., Han, Y. S. and Chun, H. J. 1992. Studies on the nutritional components of mugwort, *Artemisia mongolica*

- Fischer. Kor. J. Food Sci. Technol.* **24**, 49-53.
33. Stonāns, I., Stonāne, E., Russwurm, S., Deigner, H. P., Böhm, K. J., Wiederhold, M., Jäger, L. and Reinhart, K. 1999. HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes. *Cytokine* **11**, 151-156.
34. Sugawara, S., Arakaki, R., Rikiishi, H. and Takada, H. 1999. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and monocytes in a CD14-dependent manner. *Infect. Immun.* **67**, 1623-1632.
35. Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376.
36. Tsukamoto, S., Kanegae, T., Uchigasaki, S., Kitazawa, M., Fujioka, T., Fujioka, S., Imamura, Y. and Nagoya, T., 1993. Changes in free and bound alcohol metabolites in the urine during ethanol oxidation. *Arukuru. Kenkyuto. Yakubutsu Ison.* **28**, 441-452.
37. Uehara, A., Sugawara, S., Tamai, R. and Takada, H. 2001. Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans in the presence of soluble CD14. *Med. Microbiol. Immunol (Berl).* **189**, 185-192.
38. Xaus, J. M., Comalada, A. F., Villedor, J., Lloberas, F., Lopez-Soriano, J. M., Argiles, C. and Celada, A. 2000. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . *Blood* **95**, 3823-3831.
39. Zimmermann, H. W., Seidler, S., Gassler, N., Nattermann, J., Luedde, T., Trautwein, C. and Tacke, F. 2011. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One* **6**, e21381.

초록 : LPS에 의해 유도된 염증반응에서 섬애약썩 추출물의 간보호 효과

김동규 · 강민정 · 신정혜*
(재)남해마늘연구소

본 연구는 섬애약썩의 생리활성 규명을 위한 연구의 일환으로 물 추출물의 항염증 활성 및 간 염증에 대한 보호효과를 세포수준에서 확인하였다. 세포독성이 없는 100~400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위에서 섬애약썩 추출물은 HepG2 세포에서 nitric oxide (NO)와 reactive nitrogen species (ROS)생성을 농도의존적으로 저해하였으며, 간염 질환과 밀접한 관계가 있는 cytokine인 M-CSF와 IL-8의 발현을 감소시켰다. 또한 직접적인 간 손상을 나타낼 수 있는 지표인 AST와 ALT의 발현을 유의성 있게 감소시키는 결과를 얻을 수 있었다. 본 실험을 통해서 섬애약썩 물 추출물은 세포독성이 없는 200~400 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위에서 농도의존적으로 간 염증의 개선 효과를 가질 것이라는 단서를 확인하였다.