

# 고삼과 애엽의 발효 혼합물이 에탄올과 니코틴으로 유발된 마우스 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성감소에 미치는 영향

박완수\* · 김도훈

경원대학교 한의과대학 한의학과

## 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

Wan Su Park\*, Do Hoon Kim

College of Oriental Medicine, Kyungwon University

The purpose of this study is to investigate the effect of a mixture of fermented *Artemisiae Argi Folium* and fermented *Sophorae Radix* (FAS) on hydrogen peroxide production within mouse macrophage Raw 264.7 with ethanol (EtOH) and nicotine. *Artemisiae Argi Folium* is known to have the antibacterial, immune-enhancing properties. And *Sophorae Radix* is also known to have the antibacterial, anti-inflammatory, anti-allergic properties. EtOH and nicotine are the ones of toxicants which could impair immunocytes like macrophage. EtOH and nicotine reduce the intracellular production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of Raw 264.7. FAS increased the production of hydrogen peroxide reduced by EtOH and nicotine within Raw 264.7. These results indicate that FAS could restore the immuno-activity of macrophage impaired by EtOH and nicotine.

Key words : macrophage, *Artemisiae Argi Folium*, *Sophorae Radix*, fermented herbal drug, ethanol, nicotine

### 서 론

고삼(苦蓼; *Sophorae Radix*)은 차가운 성질(寒)에 독이 없고(無毒) 쓴 맛(苦味)을 가지고 있으며 심, 간, 위, 대장, 방광경 등으로 귀경(歸經)한다. 청열조습(淸熱燥濕)하고 거풍살충(祛風殺蟲)하며 이뇨(利尿)의 효능을 가져서 열리(熱痢), 변혈(便血), 황달노폐(黃疸尿閉), 적백대하(赤白帶下), 음종음양(陰腫陰痒), 습진(濕疹), 습창(濕瘡), 피부소양(皮膚瘙癢), 개선마풍(疥癬麻風) 등을 치료하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

애엽(艾葉; *Artemisiae Argi Folium*)은 따뜻한 성질(溫)과 약간의 독(毒)이 있는 신고지미(辛苦之味)를 가지고 있고 간, 비, 신으로 귀경한다. 주요한 효능은 찬 기운을 흩어서 통증을 멈추게 하고(散寒止痛), 경락을 따뜻하게 하여 출혈을 멎게(溫經止血) 하

는 것으로 아랫배가 차고 아픈 것(少腹冷痛), 자궁이 냉하여 임신이 잘 안되는 것(宮冷不孕), 월경불순, 토혈(吐血), 코피를 흘리는 것(衄血), 붕루경다(崩漏經多), 임신으로 인한 하혈(妊娠下血) 등을 치료하며 외용(外用)으로는 피부가려움증에 적용되기도 한다고 하였다. 또한 뜸치료의 재료로서 사용되기도 한다<sup>2)</sup>. 최근 한약재 혹은 한약을 발효하여 한약의 안전성을 높이고 효능의 증대를 시도하거나 새로운 약효를 발굴하는 다양한 연구들이 보고되고 있으며<sup>3,4)</sup> 쑥의 발효에 대한 연구도 보고되어 있다<sup>5)</sup>.

에탄올(ethanol; EtOH)과 니코틴(nicotine)은 독성물질에 속하는 것으로 인체에 유해한 다양한 현상을 일으키는 데 면역세포 중의 하나인 대식세포에 대해서도 면역기능의 손상을 초래할 수 있는 병리적 기전을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>6,7)</sup>.

본 연구에서는 고삼과 애엽을 각각 발효시킨 뒤 혼합하여 얻은 시료(FAS)가 면역기능 손상을 일으킬 수 있는 에탄올과 니코틴으로 유발된 마우스 대식세포 내의 hydrogen peroxide 생성 억제에 미치는 영향에 대해 조사, 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 박완수, 경기도 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학

· E-mail : pws98@kyungwon.ac.kr, · Tel : 031-750-8821

· 접수 : 2008/08/23 · 수정 : 2008/09/16 · 채택 : 2008/10/06

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 ethanol(EtOH)과 nicotine, Dimethyl Sulfoxide(DMSO), dihydrorhodamine 123(DHR 123) 등은 Sigma사(ST. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, Japan), freeze dryer(Eyela, Tokyo, Japan), deep freezer(Revco, NC, USA), microplate reader 680(Bio-Rad, CA, USA) 등이다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 약재 애엽(艾葉; *Artemisiae Argi Folium*)은 한국 서해안에서 채취하였고 고삼(苦蔘; *Sophorae Radix*)은 서울 제기동의 경동약령시장에서 구입하여 검증한 후 사용하였으며 검증된 약재들은 경원대학교 한의과대학 병리학교실에 보관하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료의 제조

##### (1) 艾葉 추출물 제조

艾葉 50 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. 동결건조 추출물은 6 g을 얻었으며 수율은 12%였다.

##### (2) 艾葉 발효 추출물 제조

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

① 조효소 조제 : 조효소제인 3 g  $\alpha$ -herbzyme (한국효소)에 증류수 100 ml 을 가하고 37°C에서 30분간 침출하여 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.

② 열수 추출하여 건조한 艾葉(3.0 g, pH:5.44)을 screw cap tube 0.95 g을 담고 미리 추출된 조효소액을 2.2 ml을 첨가하여 37°C에서 2시간 효소반응하였다.

③ 효소반응 후 95°C에서 10분간 살균하였다.

④ *Sacchromyces cerevisiae* STV89를 艾葉에 4%씩 접종하여 30°C에서 4일간 배양하였다.

⑤ 배양 후 60°C에서 20분간 열처리하였다.

⑥ 배양 후 pH는 5.55였다.

##### (3) 苦蔘 추출물 제조

苦蔘 50 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 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 뒤 발효할 시료로 사용하였다. 동

결건조 추출물은 9.5 g을 얻었으며, 수율은 19%였다.

#### (4) 苦蔘 발효 추출물 제조

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

① 조효소 조제 : 조효소제인 3 g  $\alpha$ -herbzyme (한국효소)에 증류수 100 ml 을 가하고 37°C에서 30분간 침출하여 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.

② 열수추출하여 건조한 苦蔘(3.0 g, pH 4.67)을 screw cap tube 0.95 g을 담고 미리 추출된 조효소액을 2.2 ml을 첨가하여 37°C에서 2시간 효소반응하였다.

③ 효소반응 후 95°C에서 10분간 살균하였다.

④ *Sacchromyces cerevisiae* STV89를 苦蔘에 4%씩 접종하여 30°C에서 4일간 배양하였다.

⑤ 배양 후 60°C에서 20분간 열처리하였다.

⑥ 배양 후 pH는 4.66였다.

#### (5) 발효 애엽과 발효 고삼의 혼합물(FAS) 제조

위에서 얻은 발효 애엽과 발효 고삼을 각각 동결건조 한 뒤 얻은 분말을 1:1의 비율로 혼합한 뒤 3차 증류수에 녹여 시료로 사용하였다.

### 2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 mouse macrophage(Raw 264.7 cell line)이며 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

#### 3) 세포 배양

Raw 264.7 cells은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells은 75 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후 75 cm<sup>2</sup> flask 당 3 ml의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

#### 4) Dihydrorhodamine 123 (DHR) assay

세포 내의 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 생성은 Roesler 등<sup>8-12</sup>의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123 (DHR) assay를 실시하여 측정하였다. DHR은 비형광이지만 세포 내에서 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 산화되어 녹색의 형광을 발현하는 물질인 rhodamine 123(R123)로 바뀌게 된다. 그러므로 여러 가지 산화적 반응을 일으키는 물질들로 인해 인간 세포 내에서 발생하는 hydrogen peroxide의 수준을 dihydrorhodamine 123 assay을 이용하여 측정할 수 있다. 본 실험에서는 EtOH, nicotine 등이 유발하는 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성억제에 대한 시료의 영향을 측정하였다. 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주되도록 1×10<sup>5</sup> cells/mL의 cell을 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 시료를 처리하기 전에 우선

DHR(10 uM)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하였다. 배지를 제거한 후 EtOH(100 uM) 혹은 nicotine(100 uM)을 처리하였다. 그리고 시료(25, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 배지에 담아 각 well에 처리하고 22, 24, 26 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 microplate reader 680(Bio-Rad, CA, USA)을 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정, 비교하였다.

3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준편차 (Mean ± S.D.)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군의 평균 차이는 Student t-test와 ANOVA test로 분석하여 P<0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. EtOH이 유발하는 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성 감소에 대한 FAS의 영향

EtOH(100u M)로 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성 억제제를 유발하고 FAS(25, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 함께 처리하여 22, 24, 26시간 동안 배양하였다. 22시간 동안 배양한 결과 EtOH에 의한 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 100, 200, 400 ug/mL의 농도에서 각각 108.1±3.69, 130.0±6.15, 147.0±4.3%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰으며 24시간 동안 배양한 결과는 25 ug/mL의 농도에서는 97.5±6.27%로 유의한 감소(p<0.05)를 나타내었으나 100, 200, 400 ug/mL의 농도에서는 각각 104.9±3.45, 127.0±5.63, 142.0±4.18%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰으며 26시간 동안 배양한 결과는 25 ug/mL의 농도에서 92.7±5.86%로 유의한 감소(p<0.05)를 나타내었으나 200, 400 ug/mL의 농도에서는 각각 125.0±5.9, 140.0±4.12%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 1-3).

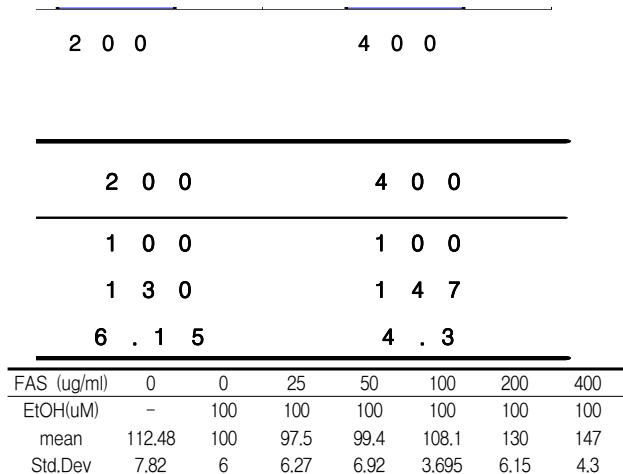


Fig. 1. Effect of FAS on the intracellular production of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of Raw 264.7 cell treated with EtOH (100 uM). Cells were incubated with FAS for 22 hr with EtOH. Results are represented as mean ± S.D. FAS : Mixture of Fermented *Artemisiae Argi Folium* and Fermented *Sophorae Radix*. Normal : Not treated with EtOH. Control : Treated with EtOH only. # represents P < 0.05 compared to the normal. \* represents P < 0.05 compared to the control.

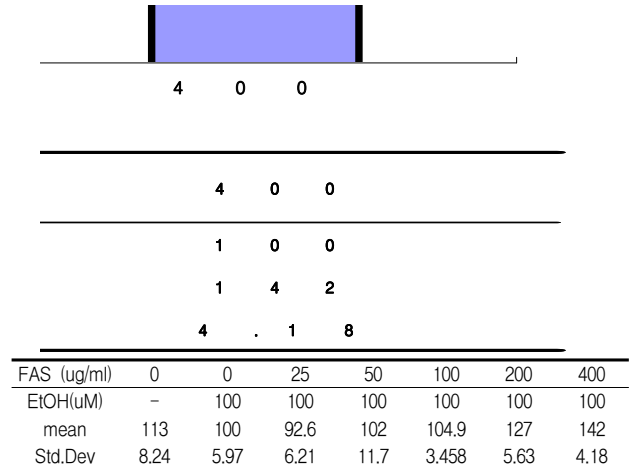


Fig. 2. Effect of FAS on the intracellular production of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of Raw 264.7 cell treated with EtOH (100 uM). Cells were incubated with FAS for 24 hr with EtOH. Results are represented as mean ± S.D. FAS : Mixture of Fermented *Artemisiae Argi Folium* and Fermented *Sophorae Radix*. Normal : Not treated with EtOH. Control : Treated with EtOH only. # represents P < 0.05 compared to the normal. \* represents P < 0.05 compared to the control.

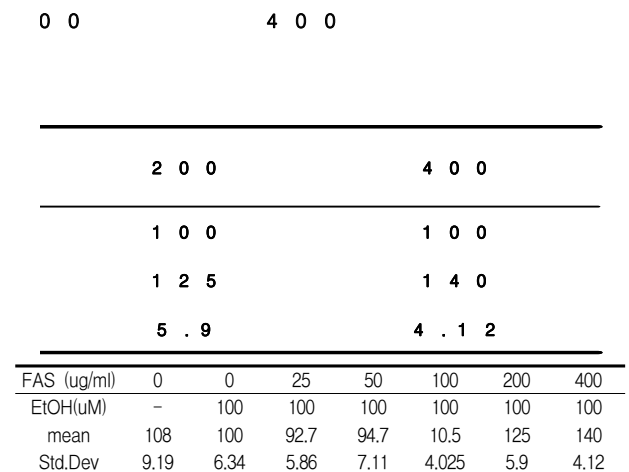
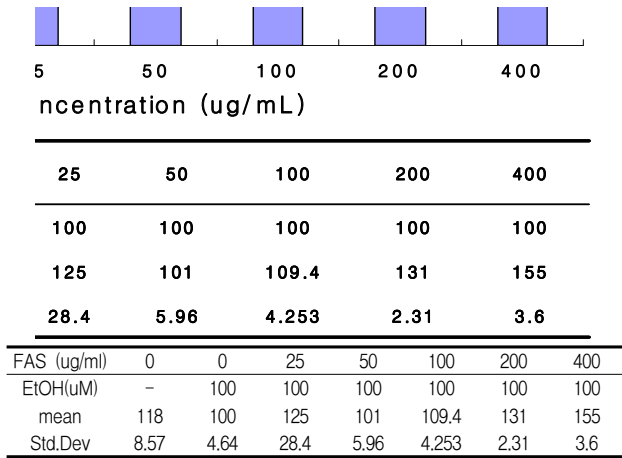


Fig. 3. Effect of FAS on the intracellular production of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of Raw 264.7 cell treated with EtOH (100 uM). Cells were incubated with FAS for 26 hr with EtOH. Results are represented as mean ± S.D. FAS : Mixture of Fermented *Artemisiae Argi Folium* and Fermented *Sophorae Radix*. Normal : Not treated with EtOH. Control : Treated with EtOH only. # represents P < 0.05 compared to the normal. \* represents P < 0.05 compared to the control.

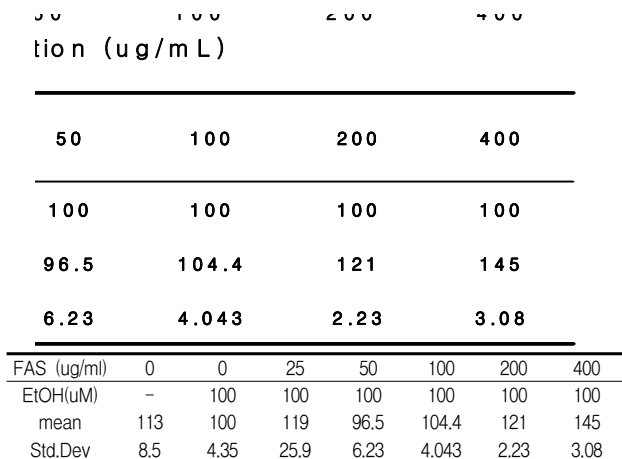
2. Nicotine이 유발하는 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성 감소에 대한 FAS의 영향

Nicotine(100 uM)으로 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 FAS(25, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 함께 처리하여 22, 24, 26시간 동안 배양하였다. 22시간 동안 배양한 결과 Nicotine에 의한 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 25, 100, 200, 400 ug/mL의 농도에서 각각 125.0±28.4, 109.4±4.25, 131.0±2.31, 155.0±3.6%로 유의하게 (p<0.05) 회복시켰으며 24시간 동안 배양한 결과에서는 25, 100, 200, 400 ug/mL의 농도에서 각각 119.0±25.9, 104.4±4.04, 121.0±2.23, 145.0±3.08%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. 26시간

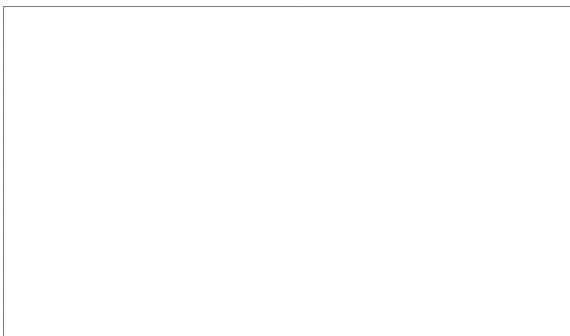
동안 배양한 결과에서도 각각 120.0±27.1, 107.1±4.30, 129.0±1.88, 152.0±3.47%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 4-6).



**Fig. 4.** Effect of FAS on the intracellular production of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of Raw 264.7 cell treated with Nicotine (100 uM). Cells were incubated with FAS for 22 hr with Nicotine. Results are represented as mean ± S.D. FAS : Mixture of Fermented *Artemisiae Argi Folium* and Fermented *Sophorae Radix*. Normal : Not treated with Nicotine. Control : Treated with Nicotine only. # represents P < 0.05 compared to the normal. \* represents P < 0.05 compared to the control.



**Fig. 5.** Effect of FAS on the intracellular production of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of Raw 264.7 cell treated with Nicotine (100 uM). Cells were incubated with FAS for 24 hr with Nicotine. Results are represented as mean ± S.D. FAS : Mixture of Fermented *Artemisiae Argi Folium* and Fermented *Sophorae Radix*. Normal : Not treated with Nicotine. Control : Treated with Nicotine only. # represents P < 0.05 compared to the normal. \* represents P < 0.05 compared to the control.



FAS (ug/ml)	0	0	25	50	100	200	400
EtOH(uM)	-	100	100	100	100	100	100
mean	113	100	120	98	107.1	129	152
Std.Dev	8.58	3.94	27.1	5.77	4.306	1.88	3.47

**Fig. 6.** Effect of FAS on the intracellular production of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of Raw 264.7 cell treated with Nicotine (100 uM). Cells were incubated with FAS for 26 hr with Nicotine. Results are represented as mean ± S.D. FAS : Mixture of Fermented *Artemisiae Argi Folium* and Fermented *Sophorae Radix*. Normal : Not treated with Nicotine. Control : Treated with Nicotine only. # represents P < 0.05 compared to the normal. \* represents P < 0.05 compared to the control.

## 고찰

고삼(苦蓼)에 대한 최근의 연구로는 정 등<sup>13)</sup>이 고삼이 BV2 microglial cells에서 ERK를 통한 TNF-alpha 생성 억제효과를 나타낸다고 하였고, 이 등<sup>14)</sup>은 항우식활성물질 분리를 보고하였으며, 권 등<sup>15)</sup>은 고삼 추출물이 XO/HX에 의한 血管内皮細胞 손상을 방어하는 효과에 대하여 보고하였고, 이 등<sup>16)</sup>은 고삼이 streptococcus mutans에 대하여 항세균 효과가 있음을 보고하였다.

애엽(艾葉)의 주요한 성분으로는 휘발성 정유가 약 0.2~0.5% 함유되어 있고 limonene, α-thujone, α-pinene, β-pinene, α-terpineneol 등으로 구성되며 이 외에도 adenine, choline, vitamin A·B·C·D와 amylase 등이 포함되어 있어서 진해거담평천(鎮咳祛痰平喘) 작용, 항혈액응고 작용, 면역증강 작용, 항균 작용 등<sup>17)</sup>이 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 약리활성을 가진 플라보노이드의 일종인 Jaceosidin, 그리고 그 밖에 scopoletin, isoscapoletin, Arteminolides B·C·D, Eudesmanolides 등<sup>18-21)</sup>이 보고되어 있다. 이 밖에 애엽에 대한 연구로 정 등<sup>22)</sup>이 황해쑥 물분획물의 L1210 세포에 대한 세포독성과 항산화효소 활성변화에 대하여 보고하였고 김 등<sup>23)</sup>은 황해쑥의 열수 및 메탄올 추출액이 H9(ATCC HTB176) 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 것과 CuZnSOD와 MnSOD 활성을 증가시킨다는 것을 보고하였다.

Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)는 세포 내에서 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 ROS 생성을 많이 하고 이는 immunologic reaction을 유발한다. 최근의 연구에서는 macrophage의 ROS 생성 증가가 T-cell과 관련된 arthritis를 억제하는 등 자가면역질환 발생을 방어하는 작용이 있음이 보고되었다<sup>24-28)</sup>. 그러므로 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하는 EtOH와 nicotine은 이러한 자가면역 질환의 발생가능성을 높이는 등 면역기능교란 유발인자가 될 수 있다.

최근 한약재 혹은 한약을 발효하여 한약의 안전성을 높이고 효능의 증대를 시도하거나 새로운 약효를 발굴하는 다양한 연구들이 보고되고 있다<sup>3,4)</sup>.

본 연구에서는 한약재의 발효화를 통한 대식세포 관련 면역질환 치료제 개발을 위한 기초연구로 발효 고삼과 발효 애엽 혼합물을 시료로 하여 EtOH와 nicotine에 의한 대식세포 내 hydrogen

peroxide 생성감소를 회복시키는 것에 대하여 조사하였다.

EtOH(100 uM)로 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 FAS(25, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 22시간 동안 배양한 결과 EtOH에 의한 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 100, 200, 400 ug/mL의 농도에서 각각 108.1±3.69, 130.0±6.15, 147.0±4.3%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰으며 24시간 동안 배양한 결과는 25 ug/mL의 농도에서는 97.5±6.27%로 유의한 감소(p<0.05)를 나타내기는 하였으나 100, 200, 400 ug/mL의 농도에서는 각각 104.9±3.45, 127.0±5.63, 142.0±4.18%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰고 26시간 동안 배양한 결과는 25 ug/mL의 농도에서 92.7±5.86%로 유의한 감소(p<0.05)를 나타내었으나 200, 400 ug/mL의 농도에서는 각각 125.0±5.9, 140.0±4.12%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. 이와 같은 결과는 에탄올에 의한 대식세포의 면역기능 교란현상 특히 세포 내 hydrogen peroxide 생성감소에 의한 면역이상반응을 FAS가 개선시킬 수 있는 것으로 해석될 수 있다.

Nicotine(100 uM)으로 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 FAS(25, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 22, 24, 26시간 동안 배양하였다. 22시간 동안 배양한 결과 Nicotine에 의한 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 25, 100, 200, 400ug/mL의 농도에서 각각 125.0±28.4, 109.4±4.25, 131.0±2.31, 155.0±3.6%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰으며 24시간 동안 배양한 결과에서는 25, 100, 200, 400 ug/mL의 농도에서 각각 119.0±25.9, 104.4±4.04, 121.0±2.23, 145.0±3.08%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. 26시간 동안 배양한 결과에서도 각각 120.0±27.1, 107.1±4.30, 129.0±1.88, 152.0±3.47%로 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. 이러한 결과는 니코틴이 유발하는 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성감소를 FAS가 회복시킴으로서 니코틴에 의한 대식세포 관련 면역이상 현상을 해소하는 효과를 가지는 것이라 할 수 있다.

## 결 론

한약재의 발효화를 통한 대식세포 관련 면역질환 치료제 개발을 위한 기초연구로 발효 고삼과 발효 애엽 혼합물을 시료로 하여 에탄올과 니코틴에 의한 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성감소를 회복시키는 것에 대하여 조사한 결과 EtOH에 의한 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 22, 24시간의 배양에서는 100 ug/mL 이상의 농도에서, 26시간의 배양에서는 200 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰으며 니코틴으로 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발한 경우에는 22, 24, 26시간의 배양에서 모두 100 ug/mL 이상일 때 유의한(p<0.05) 회복을 나타내었다.

이와 같은 결과는 에탄올과 니코틴에 의한 대식세포의 면역기능 교란현상 특히 세포 내 hydrogen peroxide 생성감소에 의한 면역이상반응을 FAS가 개선시킬 수 있는 것으로 사료되며 앞으로 자가면역질환 등 면역기능교란 질환 등의 치료제로서 발효 고삼과 발효 애엽이 개발되기 위하여 심도 깊은 연구가 필요할 것이다.

## 참고문헌

1. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, pp 185-186, 1991.
2. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, pp 405-407, 1991.
3. 정용준, 한동오, 최보희, 박철, 이혜정, 김성훈, 함대현. 발효 한약추출물 HP-1이 알코올을 투여한 쥐의 알코올 대사에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 21(2):387-391, 2007.
4. 조수인, 김형우, 이근지. 동백 발효 추출물 단기 투여의 활성화에 대한 연구. 대한본초학회지 21(2):55-62, 2006.
5. 최혁재. 발효강화숙의 간장해 보호효과. 생약학회지 38(3): 245-253, 2007.
6. Figliomeni, M.L., Turkall, R.M. Developmental immunotoxicity of cocaine and ethanol in postnatal Lewis rats. Immunopharmacology 36(1):41-48, 1997.
7. McMaster, S.K., Paul-Clark, M.J., Walters, M., Fleet, M., Anandarajah, J., Srisikandan. S., Mitchell, J.A. Br J Pharmacol. 153(3):536-543, 2008.
8. Jirapongsananuruk, O., Malech, H.L., Kuhns, D.B., Niemela, J.E., Brown, M.R., Anderson-Cohen, M., Fleisher, T.A. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. J Allergy Clin Immunol. 111(2):374-379, 2003.
9. Richardson, M.P., Ayliffe, M.J., Helbert, M., Davies, E.G. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. J Immunol Methods. 219(1-2):187-193, 1998.
10. Crow, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. Nitric Oxide. 1(2):145-157, 1997.
11. van Pelt. L.J., van Zwieten, R., Weening, R.S., Roos, D., Verhoeven, A.J., Bolscher, B.G. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. J Immunol Methods. 191(2):187-196, 1996.
12. Roesler, J., Hecht, M., Freihorst, J., Lohmann-Matthes, M.L., Emmendorffer, A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. Eur J Pediatr. 150(3):161-165, 1991.
13. 정경희, 김수철, 한미영, 박혜정. BV2 microglial cells에서 ERK를 통한 고삼의 Tnf alpha 생성 억제효과. 대한본초학회지 22(2):147-153, 2007.

14. 이현옥, 한동민, 백승화. 고삼으로부터 항우식활성 물질의 분리. *한국미생물생명공학회지* 30(4):420-424, 2002.
15. 권강범, 이호승, 김인수, 김인규, 류도곤. 苦蔘 추출물이 XO/HX에 의해 손상된 血管內皮細胞에 미치는 영향. *동의병리학회지* 17(1):549-552, 2003.
16. 이현옥, 이경희, 박남규, 정승일, 백승화, 한동민. 고삼의 *Streptococcus mutans*에 대한 항세균 효과. *한국식품영양학회지* 13(6):539-546, 2000.
17. 김호철. *한약약리학*. 서울, 집문당, pp 309-311, 2001.
18. Kim, M.J., Kim, D.H., Lee, K.W., Yoon, D.Y., Surh, Y.J. Jaceosidin induces apoptosis in ras-transformed human breast epithelial cells through generation of reactive oxygen species. *Ann N Y Acad Sci.* 1095: 483-495, 2007.
19. Jeong, M.A., Lee, K.W., Yoon, D.Y., Lee, H.J. Jaceosidin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia argyi*, inhibits phorbol-ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 by blocking phosphorylation of ERK-1 and -2 in cultured human mammary epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1095: 458-466, 2007.
20. Lee, H.G., Yu, K.A., Oh, W.K., Baeg, T.W., Oh, H.C., Ahn, J.S., Jang, W.C., Kim, J.W., Lim, J.S., Choe, Y.K., Yoon, D.Y. Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. *J Ethnopharmacol.* 98(3):339-343, 2005.
21. Adams, M., Efferth, T., Bauer, R. Activity-guided isolation of scopoletin and isoscapoletin, the inhibitory active principles towards CCRF-CEM leukaemia cells and multi-drug resistant CEM/ADR5000 cells, from *Artemisia argyi*. *Planta Med.* 72(9):862-864, 2006.
22. 정대영, 박시원. 황해쑥 물분획물의 L1210 세포에 대한 세포독성과 항산화효소 활성변화. *약학회지* 46(1):39-46, 2002.
23. 김경하, 정대영, 민태진, 박시원. 황해쑥(*Artemisia argyi*)의 열수 및 메탄올 추출액은 H9(ATCC HTB176)세포에 대한 세포독성 및 항산화효소 활성. *약학회지* 43(5):598-605, 1999.
24. Gelderman, K.A., Hultqvist, M., Pizzolla, A., Zhao, M., Nandakumar, K.S., Mattsson, R., Holmdahl, R. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J Clin Invest.* 117(10):3020-3028, 2007.
25. Gelderman, K.A., Hultqvist, M., Olsson, L.M., Bauer, K., Pizzolla, A., Olofsson, P., Holmdahl, R. Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal.* 9(10):1541-1567, 2007.
26. Hultqvist, M., Bäcklund, J., Bauer, K., Gelderman, K.A., Holmdahl, R. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunol.* 179(3):1431-1437, 2007.
27. Hultqvist, M., Olofsson, P., Gelderman, K.A., Holmberg, J., Holmdahl, R. A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS Med.* 3(9):e348, 2006.
28. Hultqvist, M., Holmdahl, R. Ncf1 (p47phox) polymorphism determines oxidative burst and the severity of arthritis in rats and mice. *Cell Immunol.* 233(2):97-101, 2005.