Nicotine으로 유발된 대식세포의 hydrogen peroxide와 Nitric Oxide 생성억제에 대한 효모균발효고삼 추출물의 영향

박완수*

경원대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of *Sacchromyces cerevisiae*-Fermented Sophorae Radix on Production of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide from Macrophage Treated with Nictoine

Wan Su Park*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

The effect of *Sacchromyces cerevisiae*-Fermented Sophorae Radix water extract (SFS) on production of hydrogen peroxide and nitric oxide (NO) from mouse macrophage Raw 264.7 Cells treated with nicotine (1 mM) was investigated through this study. SFS (0, 25, 50, 100, 200, 400 ug/mL) was simultaneously treated with nicotine (1 mM) during culture of 4, 20, 24, 44, 48, 68, and 72 hr. And the intracellular productions of hydrogen peroxide were measured by dihydrorhodamine 123 (DHR) assay. NO production after 24 hr treatement was measured with Griess reagent assay. SFS restored the production of hydrogen peroxide and NO reduced by nicotine (1 mM) in Raw 264.7 Cells. These results suggests that SFS could be supposed to have the immunological activity concerned with macrophage's oxidative burst including hydrogen peroxide and NO.

Key words : macrophage, *Sacchromyces cerevisiae*, Sophorae Radix, fermentation, hydrogen peroxide, nitric oxide

서 론

고삼(苦蔘; 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), 황달뇨폐(黃疸尿閉), 적백대하(赤白帶下), 음종음양(陰腫陰痒), 습진(濕疹), 습창(濕瘡), 피부소양(皮膚瘙痒), 개선마풍(疥癬麻風) 등을 치료하는 것으로 알려져 있다[1,2].

최근 한약의 안전성을 확보하고 효능의 증대를 위하여 한약재 발효에 대한 다양한 시도가 이루어지고 있으며, 발효한약의 면역활성에 대한 연구 또한 보고되고 있다[3].

인체가 가지고 있는 면역체계(免疫體系)는 외부로부터 침입하는 발병체(發病體)로부터 인간을 지켜내는 주요한 역할을 하는데, 면역체계를 이루는 중요한 세포들 중에 하나가 대식세포(大食細胞; macrophage)이며 대식세포는 nitric oxide(NO) 등을 이용하여 병원체로부터 인체를 보호하고, 탐식작용(phagocytosis)을 하기 때문에 탐식세포(貪食細胞)라고도 불리운다[4]. 골수의 혈구생성과정(hematopoiesis)에서 단핵전구세포(promonocyte)가 생성되어 혈액으로 들어간 뒤 성숙된 단핵구(monocyte)로 분화하며 순차적인 성장을 거치고 나서 조직으로 이동하여 특정한 조직의 대식세포가 되거나 혹은 수지상세포(dendritc cell)로 더욱 분화하게 되며 위치하는 조직마다 명칭이 달라지는 데 결합조직에 위치할 때는 '조직구(histiocyte)', 폐에서는 '폐포대식세포(alveolar macrophage)', 간에서는 '쿠퍼세포(kupffer cell)', 뇌에서는 '미세교세포(microglial cell)', 신장에서는 '혈관간세포(mesangial cell)', 뼈에서는 '파골세포(osteoclast)' 등으로 분류되고 있다[4,5].

최근의 발표에 의하면, 대식세포의 Reactive Oxygen Species(ROS) 생성·배출이 류마티스 관절염 발생을 억제하는 등 자가면역질환의 발병을 억제하는 데 중요한 역할을 하고 있

* 교신저자 : 박완수, 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2009/08/22 · 수정 : 2009/09/17 · 채택 : 2009/10/04

다[6]. 즉 대식세포에서 분출되는 ROS가 T cell 등의 과도한 림프구 활성화를 막을 수 있다는 것이며, 이것은 산화적 스트레스(oxidative stress)가 염증반응을 촉발한다는 기존의 이론과 상반되기는 하지만 류마티스성 관절염과 같은 난치성 자가면역질환의 치료법 개발과 관련해서 새로운 방향을 제시하는 것이다[7].

본 연구에서는 고삼을 효모균의 일종인 *Sacchromyces cerevisiae*로 발효시켜 얻은 시료(SFS)가 nicotine에 의해서 유발되는 마우스 대식세포 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide와 nitric oxide 생성저하에 미치는 영향을 알아보기 위하여 in vitro 실험을 수행하고 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 nicotine, dihydrorhodamine 123 (DHR) 등은 Sigma사(ST. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 동결건조기(Eyela, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), 초저온냉동고(Revco, USA), microplate reader (Bio-Rad, USA) 등이다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재 고삼(苦蔘 ; Sophorae Radix)은 (주)옴니허브(대구, 한국)로부터 구입, 검정한 후 사용하였으며 검정된 약재(No. 2008-01-0021)는 경원대학교 한의과대학 병리학교실에 보관되었다.

2. 방법

1) 시료의 제조

(1) 고삼 추출물 제조

苦蔘 50 g을 전기약탕기에 1차 증류수 1,000 mL와 함께 넣은 뒤 150분 동안 가열, 추출하였다. 추출이 끝난 뒤 추출액을 여과용지(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 9.5 g을 얻었으며 수율은 19%였다.

(2) 효모균발효고삼 추출물(SFS) 제조

위에서 만들어진 苦蔘 물추출물을 이용하여 효모균발효 고삼추출물(SFS)을 다음과 같이 제조하였다.

① 조효소 조제 : 조효소제인 3 g α-herbzyme (한국효소, 한국)에 증류수 100 mL 을 가하고 37℃에서 30분간 침출하여 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.

② 열수추출하여 건조한 苦蔘 추출물(3.0 g, pH:4.67)을 screw cap tube에 담고 미리 추출된 조효소액을 2.2 mL을 첨가하여 37℃에서 2시간 효소반응하였다.

③ 효소반응 후 95℃에서 10분간 살균하였다.

④ *Sacchromyces cerevisiae* STV89를 위 ③의 추출물에 4%씩 접종하여 30℃에서 4일간 배양하였다.

⑤ 배양 후 측정된 pH는 4.66였다.

⑥ 배양 후 60℃에서 20분간 열처리한 후 동결건조하여 효모균발효고삼 추출물(SFS) 제조를 완료, 실험에 사용하였다.

2) Cell line

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

3) 세포 배양

Raw 264.7 cells은 penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 ㎍/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 세포배양기에서 37℃, 5% CO_2의 조건하에 배양되었다. Cells이 75 cm^2 flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식되면, 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후 75 cm^2 flask 당 3 mL의 0.25 % trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37 ℃에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10 % FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 계대배양하였다.

4) Dihydrorhodamine 123 (DHR) assay

Cell 내의 hydrogen peroxide(H_2O_2) 생성은 Roesler 등[8-10]의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123 (DHR) assay를 실시하여 측정하였다. 즉, DHR은 비형광물질이지만 cell 내에서 hydrogen peroxide에 의하여 산화되어 녹색의 형광을 발현하는 물질인 rhodamine 123(R123)로 바뀌게 된다. 그러므로 여러 가지 oxidative reaction을 일으키는 물질들로 인해 macrophage 내에서 대량으로 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 수준을 dihydrorhodamine 123 assay를 이용하여 측정할 수 있는 것이다. 본 실험에서는 nicotine이 유발하는 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 시료의 영향를 측정하였다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주되도록 1×10^5 cells/mL의 cell을 각 well 당 100 ㎕씩 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간동안 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. 다음으로 배지에 녹인 시료(0, 25, 50, 100, 200, 400 ug/mL)와 nicotine(1 mM)을 각 well에 처리하고 4, 20, 24, 44, 48, 68, 72시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정, 비교하였다.

5) Nitric oxide(NO) 생성 측정

Mouse macrophage Raw 264.7 cell로부터 생성되는 nitric oxide의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^-를 griess 시약을 이용하여 측정하는 것으로 얻었다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주되도록 1×10^5 cells/mL의 cell을 100 ㎕씩 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 배지를 제거한 후 nicotine(1mM) 단독 혹은 시료(25, 50, 100, 200, 400 ug/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양

하였다. 배양이 끝난 후 상층액 100 ㎕을 채취하여 griess시약 100 ㎕을 혼합하고 15분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정, 비교하였다.

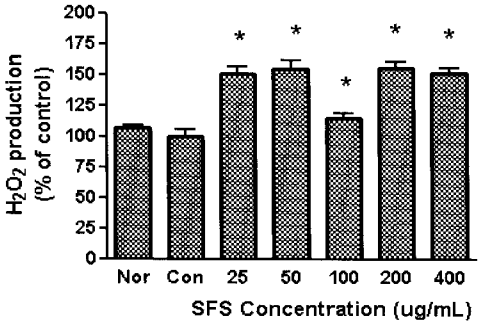
3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준편차(Mean ± S.D.)로 나타내었고, 통계적 유의성 검정은 ANOVA test와 Student t-test를 이용하여 P<0.05 수준에서 실시하였다.

결 과

1. Nicotine을 4시간 처리한 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 SFS 영향

Nicotine(1mM)을 단독 혹은 SFS(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)와 함께 4시간 배양한 후 mouse macrophage Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성을 측정한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 25 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의성 있게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 1).



SFS (㎍/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	106.60	100.00	150.56	154.78	114.61	156.04	151.82
SD	1.96	5.31	6.20	6.66	3.65	5.04	4.26

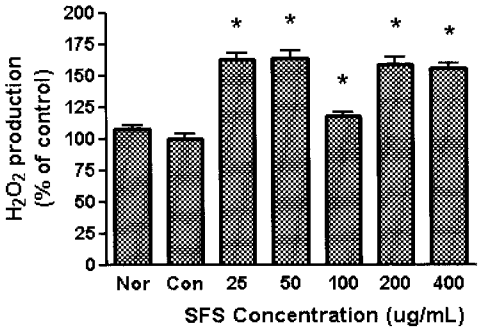
Fig. 1. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H_2O_2) of Raw 264.7 cell treated with nicotine (1 mM). Cells were incubated with SFS for 4 hr with nicotine. Results are represented as mean ± S.D. SFS : Water extract of Sophorae Radix fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with nictoine. Control : Treated with nicotine only. * represents P < 0.05 compared to the control.

2. Nicotine을 20시간 처리한 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 SFS 영향

Nicotine(1mM)을 단독 혹은 SFS(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)와 함께 20시간 배양한 후 mouse macrophage Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성을 측정한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 25 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의성 있게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 2).

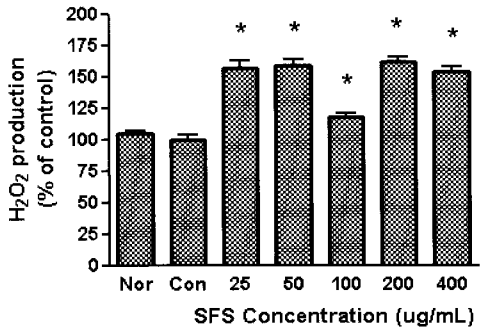
3. Nicotine을 24시간 처리한 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 SFS 영향

Nicotine(1mM)을 단독 혹은 SFS(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)와 함께 24시간 배양한 후 mouse macrophage Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성을 측정한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 25 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의성 있게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 3).



SFS (㎍/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	107.65	100.00	162.68	163.78	117.61	158.85	156.04
SD	2.77	3.35	5.31	5.53	3.50	5.41	3.80

Fig. 2. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H_2O_2) of Raw 264.7 cell treated with nicotine (1 mM). Cells were incubated with SFS for 20 hr with nicotine. Results are represented as mean ± S.D. SFS : Water extract of Sophorae Radix fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with nictoine. Control : Treated with nicotine only. * represents P < 0.05 compared to the control.



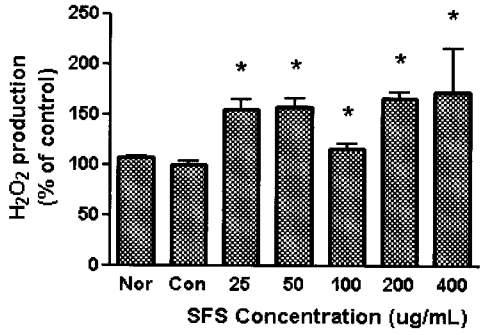
SFS (㎍/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	104.68	100.00	156.53	159.15	117.33	161.35	153.78
SD	2.16	3.60	5.78	4.74	3.46	4.74	3.85

Fig. 3. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H_2O_2) of Raw 264.7 cell treated with nicotine (1 M). Cells were incubated with SFS for 24 hr with nicotine. Results are represented as mean ± S.D. SFS : Water extract of Sophorae Radix fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with nictoine. Control : Treated with nicotine only. * represents P < 0.05 compared to the control.

4. Nicotine을 44시간 처리한 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 SFS 영향

Nicotine(1 mM)을 단독 혹은 SFS(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)와 함께 44시간 배양한 후 mouse macrophage Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성을 측정한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 25 ug/mL 이상의 농도

에서 모두 유의성 있게($p<0.05$) 회복시켰다(Fig. 4).

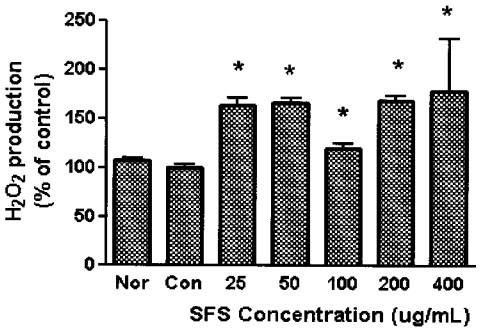


SFS (㎍/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	106.74	100.00	154.77	157.05	115.88	166.33	171.92
SD	1.53	3.15	9.51	8.64	4.53	5.14	44.21

Fig. 4. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H_2O_2) of Raw 264.7 cell treated with nicotine (1 mM). Cells were incubated with SFS for 44 hr with nicotine. Results are represented as mean ± S.D. SFS : Water extract of Sophorae Radix fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with nictoine. Control : Treated with nicotine only. * represents P 〈 0.05 compared to the control.

5. Nicotine을 48시간 처리한 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 SFS 영향

Nicotine(1 mM)을 단독 혹은 SFS(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)와 함께 48시간 배양한 후 mouse macrophage Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성을 측정한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 25 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의성 있게($p<0.05$) 회복시켰다(Fig. 5).

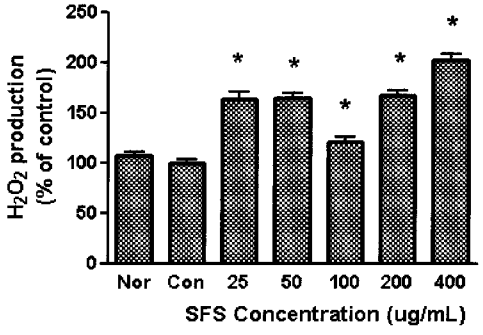


SFS (㎍/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	10.725	100.00	163.60	165.97	119.25	167.92	176.52
SD	1.87	3.56	6.73	5.49	5.16	5.22	54.00

Fig. 5. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H_2O_2) of Raw 264.7 cell treated with nicotine (1 mM). Cells were incubated with SFS for 48 hr with nicotine. Results are represented as mean ± S.D. SFS : Water extract of Sophorae Radix fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with nictoine. Control : Treated with nicotine only. * represents P 〈 0.05 compared to the control.

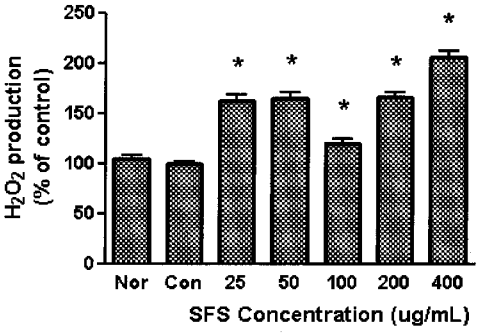
6. Nicotine을 68시간 처리한 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 SFS 영향

Nicotine(1 mM)을 단독 혹은 SFS(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)와 함께 68시간 배양한 후 mouse macrophage Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성을 측정한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 25 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의성 있게($p<0.05$) 회복시켰다(Fig. 6).



SFS (㎍/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	107.40	100.00	163.70	164.52	120.69	167.26	201.78
SD	3.29	3.33	7.36	5.43	4.67	4.98	6.00

Fig. 6. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H_2O_2) of Raw 264.7 cell treated with nicotine (1 mM). Cells were incubated with SFS for 68 hr with nicotine. Results are represented as mean ± S.D. SFS : Water extract of Sophorae Radix fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with nictoine. Control : Treated with nicotine only. * represents P 〈 0.05 compared to the control.



SFS (㎍/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	105.09	100.00	162.17	165.20	120.08	166.16	205.37
SD	3.09	2.55	6.73	5.72	4.42	4.99	7.00

Fig. 7. Effect of SFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H_2O_2) of Raw 264.7 cell treated with nicotine (1 mM). Cells were incubated with SFS for 72 hr with nicotine. Results are represented as mean ± S.D. SFS : Water extract of Sophorae Radix fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with nictoine. Control : Treated with nicotine only. * represents P 〈 0.05 compared to the control.

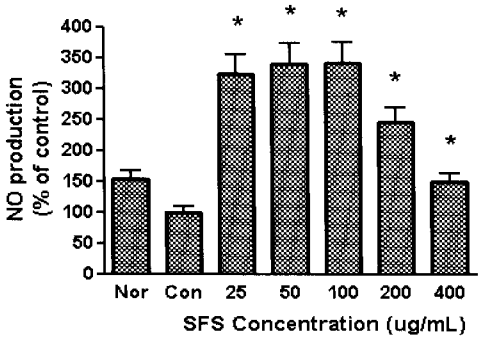
7. Nicotine을 72시간 처리한 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 SFS 영향

Nicotine(1 mM)을 단독 혹은 SFS(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)와 함께 72시간 배양한 후 mouse macrophage Raw 264.7

cell 내 hydrogen peroxide 생성을 측정한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 25 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의성 있게($p<0.05$) 회복시켰다(Fig. 7).

8. Nicotine을 24시간 처리한 Raw 264.7 cell의 NO 생성억제에 대한 SFS 영향

Nicotine(1 mM)을 단독 혹은 SFS(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)와 함께 24시간 배양한 후 mouse macrophage Raw 264.7 cell의 NO 생성을 측정한 결과 Nicotine에 의한 NO 생성감소를 25 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의성 있게($p<0.05$) 회복시켰다(Fig. 8).



SFS (μg/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	152.87	100.00	322.96	339.88	340.48	244.71	149.25
SD	15.23	10.42	32.37	34.21	34.47	24.21	15.41

Fig. 8. Effect of SFS on nitric oxide(NO) production of Raw 264.7 cell treated with nicotine (1 mM). Cells were incubated with SFS for 24 hr with nicotine. Results are represented as mean ± S.D. SFS : Water extract of Sophorae Radix fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with nictoine. Control : Treated with nicotine only. * represents $P < 0.05$ compared to the control.

고 찰

고삼(苦蔘)에는 여러종류의 alkaloids가 함유되어 있는데, 그 주성분은 matrine, oxymatrine, N-oxy-sophocarpine, sophoranol N-oxide, supanine, anagyrine 등이다[11]. 고삼(苦蔘)에 대한 최근의 연구로는 정 등[12]이 고삼이 BV2 microglial cells에서 ERK를 통한 TNF-alpha 생성 억제효과를 나타낸다고 하였고, 이 등[13]은 항우식활성물질 분리를 보고하였으며, 권 등[14]은 苦蔘 추출물이 XO/HX에 의한 血管內皮細胞 손상을 방어하는 효과에 대하여 보고하였고, 이 등[15]은 고삼이 streptococcus mutans에 대하여 항세균 효과가 있음을 보고하였다[2].

인체 면역체계에 있어 중요한 역할을 담당하는 대식세포의 세포생리활성과 관련하여 최근 대식세포의 과산화수소(hydroperoxide; H_2O_2) 생성감소가 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환의 증상악화와 관련 있다는 연구들[16-19]이 보고되어 있으며, 또한 대식세포에 의한 NO 생성감소는 외부 병원체에 대한 대항능력감소와 연관이 있는 것으로 알려져 있다[4]. 그러므로 nicotine과 같은 다양한 독성물질에 의해서 유발되는 대식세포의 활성산소종 생성감소는 자가면역질환의 유발가능성을 오히려 높인다고 할 수 있으며, NO 생성감소는 외부 병원체에 대한 인체의 저항능력을 감퇴시킬 수 있다.

최근 한약재 혹은 한약을 발효하여 한약의 안전성을 높이고 효능의 증대를 시도하거나 새로운 약효를 발굴하는 다양한 연구들이 보고되고 있다[20,21].

본 연구에서는 한약재의 발효화를 통한 대식세포 관련 면역질환 치료제 개발을 위한 기초연구로 효모균발효고삼 추출물(SFS)을 시료로 하여 nicotine에 의한 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성감소와 NO 생성감소를 회복시키는 것에 대하여 조사하였다.

Nicotine(1 mM)으로 Raw 264.7 세포내 H_2O_2 생성감소를 유발하고, SFS(25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)를 함께 처리하여 4시간동안 배양한 결과 각각 150.56, 154.78, 114.61, 156.04, 151.82%로 유의($P<0.05$)하게 증가시켰고(Fig. 1), 20시간동안의 배양한 결과에서는 각각 162.68, 163.78, 117.61, 158.85, 156.04%로 유의($P<0.05$)하게 증가시켰으며(Fig. 2), 24시간동안 배양한 결과에서는 각각 156.53, 159.15, 117.33, 161.35, 153.78%로 유의($P<0.05$)하게 증가시켰으며(Fig. 3), 44시간동안 배양한 결과에서는 각각 154.77, 157.05, 115.88, 166.33, 171.92%로 유의($P<0.05$)하게 증가시켰고(Fig. 4), 48시간동안의 배양한 결과에서는 각각 163.60, 165.97, 119.25, 167.92, 178.52%로 유의($P<0.05$)하게 증가시켰으며(Fig. 5), 68시간동안 배양한 결과에서는 각각 163.70, 164.52, 120.69, 167.26, 201.78%로 유의($P<0.05$)하게 증가시켰고(Fig. 6), 72시간동안 배양한 결과에서는 각각 162.17, 165.20, 120.08, 166.16, 205.37%로 유의($P<0.05$)하게 증가시켰다(Fig. 7). 이는 SFS가 손상된 대식세포의 ROS 생성능을 회복시킴으로써 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환의 치료에 도움을 줄 수 있음을 의미한다[16].

또한 nicotine(1 mM)으로 Raw 264.7 세포내 NO 생성감소를 유발하고, SFS(25, 50, 100, 200, 400 μg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 각각 322.96, 339.88, 340.48, 244.71, 149.25%로 유의($P<0.05$)하게 증가시켰다(Fig. 8). 이와 같이 nicotine에 의한 대식세포의 NO 생성억제현상을 SFS가 회복시키는 실험결과는 SFS가 nicotine에 의한 면역기능저하증상을 개선시킬 수 있음을 의미한다.

이상의 결과를 요약하면 고삼(Sophorae Radix)을 효모균(*Sacchromyces cerevisiae* STV89)으로 발효시켜 얻은 물추출물(SFS)이 독성물질인 nicotine(1 mM)에 의해서 유발되는 대식세포 내의 hydrogen peroxide와 nitric oxide 생성감소를 유의하게 회복시키는 활성을 가지고 있으며 hydrogen peroxide 생성증가를 통한 자가면역질환 증상개선이나 NO 생성증가를 통한 면역기능강화를 위해 사용될 수 있음을 의미하는 것이다.

결 론

Ncotine(1 mM)으로 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포내

hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 효모균발효고삼 추출물(SFS)을 함께 처리하여 4시간, 20시간, 24시간, 44시간, 48시간, 68시간, 72시간동안 배양한 결과, nicotine에 의하여 유발된 Raw 264.7 세포내 hydrogen peroxide 생성감소에 대해 SFS가 유의하게($P<0.05$) 증가시켰다. 또한 nicotine으로 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포의 NO 생성억제를 유발하고 효모균발효고삼 추출물(SFS)을 함께 처리하여 24시간 배양한 결과에서도, nicotine에 의하여 유발된 Raw 264.7 세포의 NO 생성감소를 SFS가 유의하게($P<0.05$) 증가, NO생성을 회복시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 효모균발효고삼 추출물(SFS)이 nicotine로 유발된 마우스 대식세포의 세포내 hydrogen peroxide 생성감소와 NO 생성감소를 회복시킬 수 있는 효과를 가지고 있음을 나타내며 앞으로 자가면역질환개선 및 면역기능강화와 관련된 SFS의 작용에 관하여 보다 면밀한 연구가 필요한 것으로 판단되는 바이다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 경원대학교 연구비지원에 의하여 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, pp 185-186, 1991.
2. 박완수, 김도훈. 고삼과 애엽의 발효 혼합물이 에탄올과 니코틴으로 유발된 마우스 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성감소에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 22(5):1293-1298, 2008.
3. 한효상, 박완수, 이영종. 艾葉 발효 추출물의 면역활성에 관한 연구, 대한본초학회지 23(3):103-112, 2008.
4. 박완수. 艾葉 藥鍼液이 에탄올 등에 의한 마우스 대식세포의 활성변화에 미치는 영향. 경락경혈학회지 25(3):137-146, 2008.
5. Alder, J.K., Georgantas, R.W.3rd., Hildreth, R.L., Kaplan, I.M., Morisot, S., Yu, X., McDevitt, M., Civin, C.I. Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. J Immunol. 180(8):5645-5652, 2008.
6. Hultqvist, M., Olofsson, P., Holmberg, J., Bäckström, B.T., 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. 101(34):12646-12651, 2004.
7. 박완수. Gallic acid, EtOH, LPS, Acetaminophen으로 유발된 마우스 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 애엽 물추출물의 영향 연구. 동의생리병리학회지 22(6):1495-1499, 2008.
8. Avendaño, A., Sales-Pardo, I., Marin, L., Marin, P., Petriz, J. Oxidative burst assessment and neutrophil-platelet complexes in unlysed whole blood. J Immunol Methods. 339(2):124-131, 2008.
9. 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.
10. Roesler, J., Hecht, M., Freihorst, J., Lohmann-Matthes, M.L., Emmendörffer, 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.
11. 김호철. 한약약리학. 서울, 집문당, pp 141-143, 2001.
12. 정경희, 김수철, 한미영, 박혜정. BV2 microglial cells에서 ERK를 통한 고삼의 Tnf alpha 생성 억제효과. 대한본초학회지 22(2):147-153, 2007.
13. 이현옥, 한동민, 백승화. 고삼으로부터 항우식활성 물질의 분리. 한국미생물생명공학회지 30(4):420-424, 2002.
14. 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.
15. 이현옥, 이경희, 박남규, 정승일, 백승화, 한동민. 고삼의 Streptococcus mutans에 대한 항세균 효과. 한국식품영양학회지 13(6):539-546, 2000.
16. 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.
17. 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.
18. Ncf1-associated reduced oxidative burst promotes IL-33R+ T cell-mediated adjuvant-free arthritis in mice. Hagenow, K., Gelderman, K.A., Hultqvist, M., Merky, P., Bäcklund, J., Frey, O., Kamradt, T., Holmdahl, R. J Immunol. 183(2):874-881, 2009.
19. 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.
20. 조수인, 김형우, 이근지. 동백 발효 추출물 단기 투여의 활성에 대한 연구. 대한본초학회지 21(2):55-62, 2006.
21. 최혁재. 발효강화쑥의 간장해 보호효과. 생약학회지 38(3): 245-253, 2007.