

# 길경배지 유산균이 마우스 대식세포의 NO 및 TNF-α에 미치는 영향

김성원<sup>1</sup> · 강 희<sup>2</sup> · 안광석<sup>1</sup> · 심범상<sup>1</sup> · 김성훈<sup>3</sup> · 최승훈<sup>1</sup> · 안규석<sup>1,4\*</sup>

1: 경희대학교 한의과대학 병리학교실 & 경희대학교 한의학 연구소, 2: 경희대학교 동서의학대학원 동서의과학, 3: 암예방소재개발연구센터, 4: BK21경희대학교한의학사업단

## Effects of *Lactobacillus Plantarum* Cultured in Platycodi Radix Decoction on the Eexpression of NO and TNF-α in Mouse Macrophage RAW264.7 Cell Line

Seong Won Kim<sup>1</sup>, Hee Kang<sup>2</sup>, Kwang Seok Ahn<sup>1</sup>, Bumsang Shim<sup>1</sup>, Sung Hoon Kim<sup>3</sup>, Seung Hoon Choi<sup>1</sup>, Kyoo Seok Ahn<sup>1,4\*</sup>

1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, & Institute of Oriental Medicine, Kyunghee University, 2: Department of East-West Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, 3: Cancer Preventive Material Development Research Center, 4: Brain Korea 21 Oriental Medical Science Center

This study examined the effects of *Lactobacillus plantarum*(LP) cultured in Platycodi Radix decoction(LPPR) on the expressions of NO and TNF-α in mouse macrophage RAW264.7 cell line. Cells were stimulated with LP or LPPR (0.1, 1, and 10 bacteria/cell) in all assays. More NO was induced in LPPR than LPM at 0.1 and 1 of a LP: cell ratio. The iNOS mRNA expression was also enhanced in LPPR stimulated cells. TNF-α was increased in LPPR stimulated cells at the protein and mRNA level compared with LPM. In conclusion, LP fermented in Platycodi Radix decoction induced stronger activity in NO and TNF in mouse macrophages than LPM. These results suggest that fermentation by Platycodi Radix can be useful in enhancing the immunostimulatory activity of LP.

Key words : platycodi radix, TNF-α, NO, *lactobacillus plantarum*(LP), fermentation

### 서 론

발효(醱酵)는 넓은 의미로는 미생물이나 균류 등을 이용해 인간에게 유용한 물질을 얻어내는 과정을 말하고, 좁은 의미로는 산소를 사용하지 않고 에너지를 얻는 당 분해과정을 말한다<sup>1,2)</sup>. 인체에 유익한 미생물의 대표적인 유산균은 포도당 또는 유당과 같은 탄수화물을 분해하여 유산(젖산)이나 초산과 같은 유기산을 생성하는 균이다.

길경(Platycodi Radix)은 한국, 중국 및 일본 등지에 널리 자생하는 다년생 초본인 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 도라지 *Platycodon grandiflorum*(JACQ.) A. DC의 뿌리를 건조한 것

으로, 봄과 가을에 채취하여 晒乾하여 사용한다<sup>3,4)</sup>. 神農本草經 下品에 “味辛微溫, 主胸脇痛如刀刺, 腹滿腸鳴幽幽, 驚恐悸氣”<sup>5)</sup>라고 수록되어 있고, 醫學入門에는 “苦辛提氣血, 頭目鼻咽皆肺熱, 胸脇腹腸多有痰, 不定驚癇排瘡癰”<sup>6)</sup>이라 되어 있다.

길경의 주요 약리 성분은 사포닌성분인 platycodin D로, 거담, 진해, 소염, 해열, 진통, 진정, 항위궤양, 위액분비 억제, 평활근이완, 혈당강하, 콜레스테롤강하 등의 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다<sup>7)</sup>. 桔梗은 탄수화물과 섬유소가 많고, 칼슘과 철분이 풍부한 알칼리성 식품으로<sup>8)</sup>, 도라지김치 등의 유산균 발효식품이 식생활에 이용되고 있다.

길경발효를 통한 유산균의 활성화에 관한 이번 연구는, 근래 한약의 새로운 제형으로 관심을 끌고 있는 발효한약의 효과를 유산균의 활성을 가지고 실험한 것이다. 여러 가지 한약재 중 길경을 실험에 사용한 것은 발효의 형태로 손쉽게 섭취할 수 있는

\* 교신저자 : 안규석, 서울시 동대문구 회기동 경희대학교 한의과대학

· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0335

· 접수 : 2009/03/10 · 수정 : 2009/03/23 · 채택 : 2009/04/09

약재이기 때문이다.

본 연구는 유산균 전용 배지에서 배양된 유산균과, 길경추출물에서 배양된 유산균의 효능을 비교하기 위해 마우스대식세포주 RAW264.7 cell line과 함께 배양함으로써 RAW264.7 세포가 분비하는 nitric oxide(NO)와 tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ )의 단백질 및 mRNA를 측정하여 유의한 결과가 있기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 유산균

본 실험에서 사용된 균주는 *Lactobacillus plantarum* CM201 (KCTC 11158BP) (이하 LP)으로써 콤비메드(주)에서 등록한 균을 사용하였다. 선별된 균주는 순수 배양을 통해 분리, 동정하여 10% Skim milk+Glycerol (1:1) 동결건조 Stock에 넣어, -72°C 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다.

### 2. 세포주

사용된 세포주는 RAW264.7 macrophage cell line이며 한국 세포주은행에서 분양받았다.

### 3. 배지 및 시약

Fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic는 GIBCO에서 구입하였고 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)은 WelGene에서 구입하였다. ELISA에 사용한 모든 EIA kit는 R&D Systems (USA)에서 구입하였다. Superscript Reverse Transcriptase는 Invitrogen (USA)에서 구입하였으며 Power SYBR Green PCR Master Mix는 Applied Biosystems (USA)에서 구입하였다. RNeasy Mini kit는 Qiagen (Germany)에서 구입하였다.

### 4. 한약 발효

1.5 kg 길경을 2시간 동안 9.9 L의 물에 열탕하여 얻은 액상 상태 6 L를 발효에 사용하였다. LP균의 배양은 동결 건조 앰플에 들어 있는 균주를 MRS broth 10 ml에 1% 접종하여 37°C incubator에서 16시간 동안 정지 배양하였다. 이 과정을 3회 반복하여 균을 활성화 시킨 후, 이를 종배양으로 사용하여 발효기 (KoBioTech, Korea)에서 혐기적인 상태로 37°C에서 16시간에서 18시간 배양하였다. 길경 발효는 액상 길경 100%를 배지로 사용하였으며 액상 길경을 121°C, 1.2 kgf/cm<sup>2</sup>에서 20분간 멸균한 후, 종배양한 LP균을 0.5% (약  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml) 되도록 접종하여 37°C, 100rpm, pH 5.0으로 조절(pH control solution으로 5% ammonia solution 사용), 16시간 배양하였다.

### 5. Viability assay

시료에 대한 RAW264.7 cell의 생존률은 CellTiter 96 TM non-radioactive cell proliferation assay (Promega, U.S.A.)의 protocol에 준하되  $2 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l의 농도로 접종한 후 세포가 confluent해지면 serum free DMEM에 유산균과 길경으로 배

양한 유산균을 RAW264.7 cell을 기준으로 1:10, 1:1, 10:1의 비율로 처리하였고, 20시간 배양한 후 cell titer 96R aqueous one solution reagent를 첨가하였다. Formazon product는 microplate reader (Biorad Model 680)를 이용하여 optical density 490-650 nm에서 측정하였다.

### 6. 산화질소 (Nitrite oxide) 측정

RAW264.7 cell를  $5 \times 10^5$  cells/ml로 접종한 후 세포가 confluent해지면 serum free DMEM에 유산균과 길경으로 배양한 유산균을 RAW264.7 cell을 기준으로 1:10, 1:1, 10:1의 비율로 처리하였고 양성대조군으로서 LPS 1  $\mu$ g/ml을 처리하였다. 24시간후에 배양액을 회수하여 100  $\mu$ l의 세포 배양액과 100  $\mu$ l의 Griess reagent (Sigma)를 96-well plate에 옮겨 실온에 10분간 배양한 후 microplate reader를 이용하여 optical density 540 nm에서 측정하였다. 산화질소의 농도는 아질산나트륨의 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

### 7. ELISA 측정

RAW264.7 cell를  $5 \times 10^5$  cells/ml로 접종한 후 세포가 confluent해지면 serum free DMEM에 유산균과 길경으로 배양한 유산균을 RAW264.7 cell을 기준으로 1:10, 1:1, 10:1의 비율로 처리하였고 24 시간후에 배양액을 회수하였다. TNF- $\alpha$ 의 생산량은 sandwich ELISA 방법으로 측정하였으며 각 시료는 duplicate로 시행하였다. 측정 대상에 따라 각 1차 항체 원액을 coating 완충용액에 해당 농도가 되도록 희석하여 96-well micro plate에 well 당 100  $\mu$ l씩 분주한 후 4°C에서 overnight 반응하였다. 1% BSA가 함유된 PBS를 well 당 200  $\mu$ l씩 넣고 1시간 동안 상온에 두어 blocking하였다. 각 well을 세척용 완충용액으로 3회 세척한 후 시료 및 스탠더드를 적당량 희석하여 100  $\mu$ l씩 분주하였다. 2 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 3회 세척 후 biotin이 결합된 2차 항체를 1% BSA가 함유된 PBS에 희석하여 well 당 100  $\mu$ l씩 처리하여 1 시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척후에 Streptavidin-HRP 용액으로 20분간 상온에서 반응시킨 후 세척하였다. TMB 용액을 well 당 100  $\mu$ l씩 처리한 후 30분 동안 상온에서 반응후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액을 well 당 50  $\mu$ l씩 첨가함으로써 완료하였으며 흡광도는 450-570 nm 파장에서 microplate reader기를 사용하여 측정하였다.

### 8. Real-time RT-PCR

RAW264.7 cell을 6-well plate에  $2 \times 10^6$  cells으로 접종한 후 세포가 confluent해지면 serum free DMEM에 유산균과 길경으로 배양한 유산균을 RAW264.7 cell을 기준으로 1:10, 1:1, 10:1의 비율로 처리하였고 24 시간후에 세포를 회수하였다. RNA는 RNeasy mini kit의 protocol에 준하여 분리하였다. 분리한 RNA는 증류수에 녹인 다음 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc. USA)를 이용하여 정량하였다. cDNA 합성을 위해 2.0  $\mu$ g의 RNA를 먼저 1  $\mu$ l의 oligo(dT) primer와 1  $\mu$ l의 dNTP mix를 tube에 증류수와 섞은 후 65°C에 5분간 넣고 반응한

후 4°C에 바로 냉각하였다. 이어서 반응액에 4 μl의 5X First-Strand buffer, 2 μl의 0.1 M DTT, 0.25 μl SuperScript II RT를 증류수에 넣어 최종 부피를 20 μl로 만들고 50분간 42°C에서 반응한 후 70°C에서 15분간 가열하여 효소들을 inactivation하였다. 각각의 유전자 발현량을 측정하기 위해 cDNA를 이용하여 real-time RT PCR를 실시하였다. 각 프라이머의 서열은 다음과 같다.

forward TNF-α: ATGATCCGCGACGTGGAA  
 reward TNF-α: ACCGCCTGGAGTTCCTGGAA  
 forward iNOS: CCTCCACCCTACCAAGT  
 reward iNOS: CAGCTCCAAGGAAGAGTGA  
 forward GAPDH: GGCATGGACTGTGGTCATGA  
 reward GAPDH: TTCACCACCATGGAGAAGGC

적당량 희석된 cDNA에 10 μl의 SYBR Green PCR Master Mix와 각각의 10 pM forward, reward primer 를 1.2 μl씩 증류수를 넣어 20 μl가 되게 한 후 ABI 7300 sequence detector (Applied Biosystems, USA)에서 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 denaturation한 후 95°C 15초, 60°C 60초를 40 cycle 반복하였다. 각 유전자의 threshold of cycle (Ct)값에 대한 standard curve는 한약을 처리하지 않은 cDNA를 각각 1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000로 희석하여 얻은 Ct값으로 구하였고 이 공식을 통해 샘플의 Ct를 정량화하였다. 모든 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다.

9. 통계분석

모든 결과는 SPSS 12.0 버전을 이용하여 분석하였으며 평균의 차이는 non-paired student's t-test로 분석하였다. P 값이 0.05 미만의 것만을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. LP균과 길경발효LP균이 RAW264.7 세포주에 미치는 세포독성  
 마우스 대식세포에 대해 유산균을 대식세포 대비 1/10, 1, 10배의 농도로 처리한 후, 세포독성을 확인하기 위해 20시간 후 MTS solution을 처리하여 RAW264.7의 세포수를 측정하였다. 고 농도를 제외하고는 LP균을 처리했을 때보다 길경발효LP균을 1/10배, 1배 처리했을 때 높은 생존률을 보여주었으며 통계적으로 유의하였다(Fig. 1). 특히 길경으로 배양한 LP균 처리군은 대 식세포와 동수로 처리했을 때 가장 높은 생존률을 보여주었다 (Fig. 1).

2. 길경발효LP균이 RAW264.7 세포의 NO 합성에 미치는 영향  
 RAW264.7 세포에 LP균 및 길경발효LP균을 처리하여 RAW264.7 세포의 NO 합성을 알아보았다. NO는 불안정하여 바로 측정할 수 없으므로 산화질소의 대사산물인 nitrite 양을 측정 하였다. 양성 대조군으로 LPS를 처리한 대식세포가 가장 많은 NO 양을 합성하였다. LP균만 처리한 경우 대식세포의 1/10과 1 배 처리시 비슷한 양의 NO를 합성하였고 10배 처리시 높은 양으로 NO를 합성하였다. 길경발효LP균 처리군은 대식세포의

1/10과 1배수로 접종했을 때 LP균 처리군보다 동일농도 대비 219%, 449% 증가하였으며 통계적으로 유의성이 있었다. 그러나 10 배로 처리했을 때는 길경발효LP균이 오히려 감소하였다. 따라서 유산균을 적은 수로 접종했을 때 길경으로 발효하면 NO를 분비하는 능력이 더 강해짐을 알 수 있었다(Fig. 2).

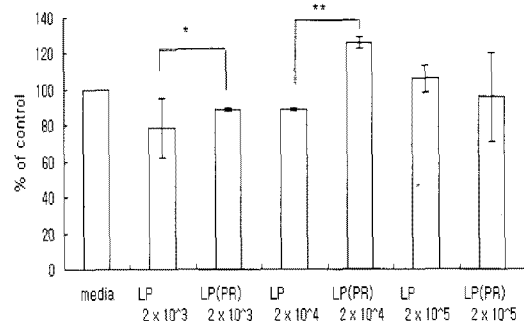


Fig. 1. Viability of RAW 264. 7 macrophage cell lines treated with heat-killed *Lactobacillus plantarum* (LP) and fermented *Platycodon Radix*(LP (PR)). Cell viability was measured using the MTS solution. \* P <0.05, \*\* P <0.01

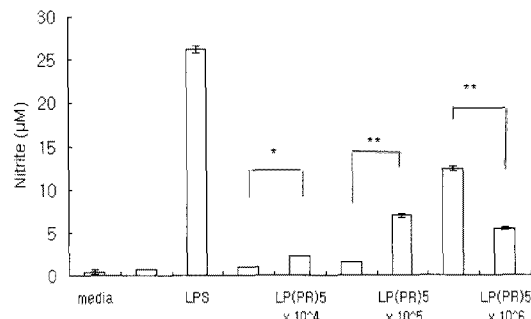


Fig. 2. NO accumulation in RAW264.7 cells treated with heat killed LP and fermented PR (LP(PR)). NO in the medium was detected by the Griess reaction. \* P <0.05, \*\* P <0.01

3. 길경발효LP균이 RAW264.7 세포의 iNOS 합성에 미치는 영향  
 NO를 생성하기 위해서 필요한 inducible nitric synthase (iNOS) 단백질 발현에 길경발효가 미치는 영향을 알기 위해 iNOS 단백질 mRNA 변화를 real time RT-PCR으로 측정하였다. 실험 결과 LP균 처리군과 길경발효LP균 처리군은 농도의존적으로 iNOS mRNA 양이 증가하였다(Fig. 3). LP균 처리군과 길경발효 LP균 처리군을 비교했을 때 대식세포 대비 유산균을 10배 (2x10<sup>7</sup>) 처리했을 때 길경발효를 처리한 세포에서 유의성있게 발현량이 증가하였음을 확인하였다.

4. 길경발효LP균이 RAW264.7 세포의 TNF-α 분비에 미치는 영향  
 TNF-α는 염증성 자극을 받은 후 신속하게 만들어져 세포외로 분비되는데 본 실험에서는 RAW264.7 세포에 LP균 및 길경발효LP균을 24 시간 처리한 후 TNF-α 분비량을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 실험결과 양성대조군으로 이용한 LPS는 다량의 TNF-α 분비를 유도하였다(Fig. 4). 이에 반해 본 실험에 이용된 LP균 처리군은 저농도에서는 검출되지 않았으나 그 이상의

농도에서는 집종된 균수에 비례하여 TNF- $\alpha$  양도 증가하였다. 한편 길경발효LP균 처리군에서는 균수에 비례하여 TNF- $\alpha$  분비가 증가하였으며 LP균만 처리한 것과 비교시 TNF- $\alpha$  분비량이 유의성있게 증가하였음을 확인할 수 있었다.

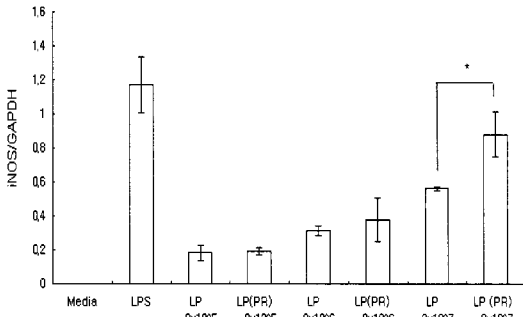


Fig. 3. Transcription of iNOS mRNA in RAW264.7 cells treated with LP and fermented PR. Expression of iNOS was measured using real-time RT PCR. \* P < 0.05

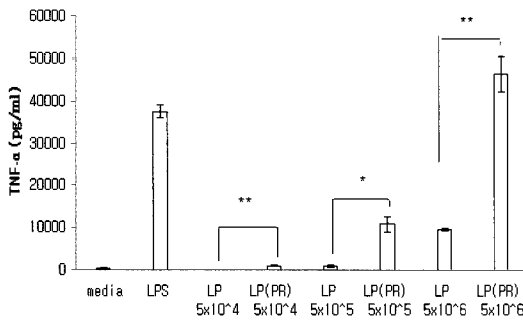


Fig. 4. Production of TNF- $\alpha$  in RAW264.7 cells treated with LP and fermented PR(LP(PR)). Cytokine concentrations were measured using ELISA. \* P < 0.05, \*\* P < 0.001

5. 길경발효LP균이 RAW264.7 세포의 TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 영향

본 실험에서는 real-time RT PCR 방법을 이용하여 LP균과 길경발효LP균의 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량을 비교하였다. 그 결과 LP균 처리군과 길경발효 처리군 모두 농도의존적으로 증가하되 길경발효LP균 처리군이 LP균 처리군보다 각 농도에서 유의성있게 더 많이 발현되었다(Fig. 5).

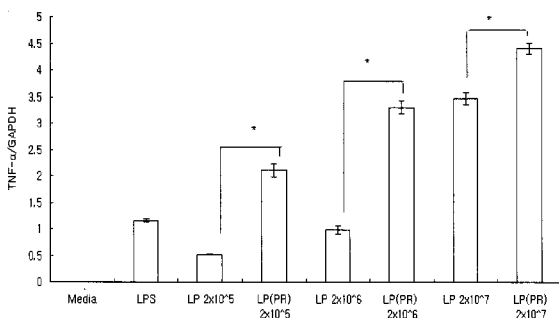


Fig. 5. Transcription of TNF- $\alpha$  in RAW264.7 cells treated with LP and fermented PR (LP(PR)). Gene expression was measured using real-time RT PCR. \* P < 0.01

고 찰

유산균이 인체의 면역을 조절, 활성화시키고, 항암작용이 있다는 것은 최근의 연구 결과로 알려져 있다<sup>9,10</sup>. 발효한약과 관련된 연구는 한의학계 외에서도 많이 이루어지고 있는데<sup>11,12</sup>, 근래에는 한의계 내에서도 湯, 膏, 散, 丸과는 달리, 한약을 발효해서 치료에 사용하는 방법이 시도되고 있다.

발효(醱酵)는 넓은 의미로는 미생물이나 균류 등을 이용해 인간에게 유용한 물질을 얻어내는 과정을 말하고, 좁은 의미로는 산소를 사용하지 않고 에너지를 얻는 당 분해과정을 말한다. 미생물의 물질대사는 분자 상의 산소를 이용하여 생체 내에서 탄수화물, 단백질 및 지방 등의 유기화합물을 완전히 산화하여 CO<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O까지 분해하는 호기성 대사과정과, 산소가 없는 환경에서 유기화합물의 완전한 분해가 이루어지지 않아, CO<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O 이외에 대사 중간물질이 생성되는 혐기적 대사과정으로 대별되며, 각각 호흡(respiration)과 발효(fermentation)라는 형식을 취하게 된다<sup>7,8</sup>.

유산균은 포도당 또는 유당과 같은 당류를 분해하여 유산을 만드는 박테리아로, 유산균이 당으로부터 유산(젖산)을 만드는 발효과정을 거쳐서 발효유, 치즈, 버터와 같은 발효식품이 만들어진다<sup>13</sup>. 유산균은 무수히 많은 종류가 있지만, 크게 활용면에서 나눠보면 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* 속으로 나눌 수 있다. 그 중에서 *Lactobacillus plantarum*은 *Lactobacillus*속의 주요 유산균으로 치즈, 소금에 절인 양배추, 피클, 김치, 절임 등에서도 볼 수 있으며, 자연계에 널리 분포되어 있다. 김치의 숙성에도 관여하고, 식염내성이 비교적 큰 편이다. *Lactobacillus plantarum*은 장내에서 잘 검출되며, 살아있는 채로 장내에 도달할 수 있으나 장내에서 식하지는 않는다<sup>13-15</sup>.

RAW264.7 세포주에 미치는 세포생존능검사에서 LP균 처리군은 세포수 의존적인 독성을 보였으며, 길경발효LP균 처리군은 LP균 처리군에 비해 높은 생존률을 보여주었다. 길경으로 배양한 LP균 처리군은 대식세포의 동수로 처리했을 때 가장 높은 생존률을 보여주었다.

유산균이 인체 면역계와 작용하여, 자연면역에 관여하는 사이토카인을 분비한다는 연구들이 최근 보고되고 있다<sup>16</sup>. 사이토카인(cytokine)은 면역계에 관여하는 세포에서 분비되는 단백질로, 대개 활성화 자극에 의해 유리되고, 특별한 수용체와 결합하면서 반응을 유도하는데, 세포간의 의사소통을 원활하게 하는 면역체계 신호전달물질이다. 사이토카인은 분비된 후, 다른 세포나 자신에게 영향을 주며, 대식세포의 증식을 유도하거나 자기 자신의 분화를 촉진하기도 한다<sup>17,18</sup>.

대식세포를 유산균과 같은 미생물로 자극하면 TNF- $\alpha$ 를 합성하여 분비한다. TNF- $\alpha$ 는 사이토카인의 한 종류로, 종양세포 표면의 TNF- $\alpha$  수용체에 결합하여 표적세포의 대사에 변화를 끼쳐 종양세포에 독성을 나타냄으로써 그 기능이 처음으로 밝혀졌다<sup>19</sup>. TNF- $\alpha$ 는 감염 부위로 호중구와 단핵구의 이동을 자극함으로써 미생물을 제거한다. 면역반응의 초기에 분비되어, 염증의

활성화, 호중구 활성화, 시상하부의 열, 간장에서의 급성단계의 단백질 합성, 근육의 이화작용, 세포 교사 등의 역할을 하지만, 다량의 TNF- $\alpha$ 의 발현은 심근 수축력 감소, 혈압강화, 대사과정의 손상을 유발하기도 한다<sup>18)</sup>.

본 실험에서 RAW264.7 세포에 LP균 및 길경발효LP균을 처리하여 RAW264.7 세포의 TNF- $\alpha$  분비량을 측정된 결과, 양성대조군으로 이용한 LPS는 다량의 TNF- $\alpha$  분비를 유도하였다. 이에 반해 본 실험에 이용된 LP균 처리군은 저농도에서는 검출되지 않았으나 그 이상의 농도에서는 점종된 균수에 비례하여 TNF- $\alpha$  양도 증가하였다.

한편 길경발효LP균 처리군에서는 현저하게 TNF- $\alpha$ 분비가 증가하였으며 이러한 증가는 LP균만을 처리한 세포보다 증가량이 많았다. RAW264.7 세포의 TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, LP균 처리군과 길경발효LP균 처리군은 농도의존적으로 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량이 증가하였으며 LP균 처리군보다 길경발효LP균 처리군의 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량이 유의성있게 더 높았다.

활성이 강한 자유 라디칼인 산화질소(NO)는 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할을 한다. 신경전달물질 및 2차 정보전달물질로 작용하며, 포식 용해소체 내에서 포식세포 산화효소에 의해 발생하는 과산화수소나 과산화물과 결합하여 미생물을 사멸시킬 수 있는 과산화질소 라디칼을 생산한다<sup>18,20,21)</sup>. NO는 NOS(nitric oxide synthase)에 의하여 L-arginine의 산화로부터 합성되며, 특히 대식세포가 LPS로 자극될 때 iNOS(inducible NOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NO는 혈관내피세포에서는 혈압조절인자, 신경세포에서는 신경자극전달물질, 대식세포에서는 항암 또는 항미생물 효과를 나타낸다. 하지만 과도한 NO는 정상세포를 죽이거나 염증을 촉진시키는 작용을 한다<sup>22-24)</sup>.

RAW264.7 세포에 LP균 및 길경발효LP균을 처리하여 RAW264.7 세포의 NO 합성을 알아본 결과, 양성 대조군으로 LPS를 처리한 대식세포가 가장 많은 NO 양을 합성하였다. LP균 처리군은 대식세포의 1/10과 1배 처리시 비슷한 양의 NO를 합성하였으나 10배 처리시 높은 양으로 NO를 합성하였다. 길경발효LP균 처리군은 대식세포의 1/10과 1배수로 점종했을 때 LP균 처리군보다 동일농도 대비 219%, 449% 증가하였으나 10 배로 처리했을 때는 오히려 감소하였다. 따라서 유산균을 적은 수로 점종했을 때 길경으로 발효하면 NO를 분비하는 능력이 더 강해짐을 알 수 있었다. iNOS 합성에 미치는 영향을 확인한 결과, LP균 처리군은 농도의존적으로 iNOS mRNA 양이 증가하였다. 길경발효LP균 처리군 역시 농도의존적으로 증가하였는데 LP균 처리군과 동수 비교시 더 많은 양을 발현하였음을 확인하였다.

이러한 TNF- $\alpha$ 의 분비와 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현, 그리고 NO와 iNOS의 합성결과를 보면, 길경발효를 했을 경우에 유산균이 인체의 면역계를 활성화시키는 능력이 더 강해짐을 알 수 있는데, 이는 평소에 유산균이 인체의 면역계를 훈련시켜주는 역할을 할 때 일반 유산균보다 길경발효를 했을 경우에 더 좋은 효과를 기대할 수 있음을 의미한다.

## 결 론

본 연구는 유산균 전용 배지에서 배양된 유산균과, 길경추출물에서 배양된 유산균의 효능을 비교하기 위해 마우스대식세포주 RAW264.7 cell line과 함께 배양함으로써 RAW264.7 세포가 분비하는 NO와 TNF- $\alpha$ 의 단백질 및 mRNA를 측정하였다.

RAW264.7 세포주에 미치는 세포독성을 확인한 결과, LP균 처리군은 세포수 의존적인 독성을 보였으며, 길경발효LP균 처리군은 LP균 처리군에 비해 높은 생존률을 보여주었다. 길경으로 배양한 LP균 처리군은 대식세포와 동수로 처리했을 때 가장 높은 생존률을 보여주었다. RAW264.7 세포의 NO 합성을 알아본 결과, 양성 대조군으로 LPS를 처리한 대식세포가 가장 많은 NO 양을 합성하였다. LP균 처리군은 대식세포의 1/10과 1배 처리시 비슷한 양의 NO를 합성하였으나 10배 처리시 높은 양으로 NO를 합성하였다. 길경발효LP균 처리군은 대식세포의 1/10과 1배수로 점종했을 때 LP균 처리군보다 동일농도 대비 219%, 449% 증가하였으나 10 배로 처리했을 때는 오히려 감소하였다. 따라서 유산균을 적은 수로 점종했을 때 길경으로 발효하면 NO를 분비하는 능력이 더 강해짐을 알 수 있었다. iNOS 단백질 mRNA 변화를 real time RT-PCR으로 측정된 결과, LP균 처리군은 농도의존적으로 iNOS mRNA 양이 증가하였다. 길경발효LP균 처리군 역시 농도의존적으로 증가하였는데 LP균 처리군과 동수 비교시 더 많은 양을 발현하였음을 확인하였다. RAW264.7 세포의 TNF- $\alpha$  분비에 미치는 영향을 확인한 결과, 본 실험에 이용된 LP균 처리군과 길경발효LP균 처리군 모두 점종된 균수에 비례하여 TNF- $\alpha$ 양이 증가하였으며 특히 길경발효LP균 처리군이 LP균만 처리한 세포보다 TNF- $\alpha$  분비가 더 증가하였음을 알 수 있었다. TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, LP균 처리군과 길경발효LP균 처리군은 모두 농도의존적으로 TNF- $\alpha$  mRNA 발현이 증가하였으며 특히 LP균 처리군보다 길경발효LP균 처리군의 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량이 비교적 높았다.

## 감사의 글

본 과제는 경희대학교 "아토피질환 치료를 위한 한약발효제제 및 치료기술의 개발" 과제에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

1. 민경찬, 전정일, 박상기, 조남철, 정수현, 유현주. 필수 식품미생물학. 광문각, pp 295-300, 2004.
2. 심상국, 손흥수, 심창환, 윤원호, 황종현. 발효식품학. 진로연구사, p 11, 2008.
3. 신민교. 임상본초학. 영림사, 서울, pp 749-780, 1997.
4. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 영림사, 서울, p 460, 1998.
- 5.王大觀, 熊輔信, 彭泉. 本草經義疏. 人民衛生出版社, p 322, 1995.

6. 李 梴. 醫學入門. 고려의학, p 165, 1989.
7. 김호철. 한약약리학. 집문당, pp 350-352, 2008.
8. 이영은, 홍승현. 한방식품재료학. 교문사, pp 152-153, 2004.
9. 이정우. 유산균의 면역조절 효과 및 항종양 효과. 서울대 대학원 석사학위 논문, 2003.
10. 김현주. 유산균 세포벽 성분의 항암 및 면역 활성화에 관한 연구, 성균관대 대학원 석사학위 논문, 2004.
11. 공병만. 백삼, 홍삼, 발효인삼 농축액의 이화학적특성 및 약리효능에 관한 연구. 공병만 경희대 대학원 한방재료공학과 박사학위 논문, 2008.
12. 조임식. 구기자(Lycium chinense Miller) 첨가에 따른 요구르트의 발효특성과 기능효과. 충남대 대학원 낙농생산 및 유가공학 박사학위 논문, 2004.
13. 강국희. 유산균식품학. 성균관대학교출판부, pp 25-28, 192-236, 1996.
14. 방병호, 서현창, 심상국, 용준형, 윤원호, 조갑연, 채기수, 최연배. 식품미생물학. 진로, pp 79-80, 2008.
15. [https://www.yakult.co.kr/lactic/story01\\_02.asp](https://www.yakult.co.kr/lactic/story01_02.asp).
16. Yun-Gi Kim, Toshihisa Ohta, Takuya Takahashi, Akira Kushiro, Koji Nomoto, Teruo Yokokura, Nobuhiko Okada, Hirofumi Danbara. Probiotic Lactobacillus casei activates innate Immunity via NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase signaling pathways, Microbes and Infection 8: 994-1005, 2006.
17. Janeway, Travers, Walport, Shlomchik. 면역생물학. 라이프사이언스, p 13, 78, 369, 2005.
18. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. 세포분자면역학. 범문사, pp 243-274, 288, 2004.
19. Trudy McKee, James R., KcKee, 생화학길라잡이. 라이프사이언스, p 418, 2006.
20. 곽한식, 김재원, 김하근, 방선권, 서경훈, 이상수, 장세현, 정혜신. 생화학. 라이프사이언스, p 997, 2008.
21. Lubert Stryer 외 2명. 생화학(하). (주)서울외국서적, pp 686-687, 2003.
22. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264. 7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach, Eur J Pharmacol. 406(3):301-309, 2000.
23. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppression nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophage, Life Sci. 35: 625-635, 2001.
24. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O. et al. The aqueous extract of Rhodiola sachalinensis root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene' in RAW 264.7 macrophage, J Ethnopharmacol, 76: 119-123, 2001.