

유산균발효애엽과 효모균발효애엽 물추출물의 종양괴사인자-알파 생성촉진효과

김연섭 · 박완수*

경원대학교 한의과대학

Effect of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Lactobacillus Pentosus* and *Saccharomyces Cerevisiae* on TNF- α Production in RAW 264.7 and HepG2 Cells

Youn Sub Kim, Wan Su Park*

College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a major mediator of immuno-inflammatory activity. The purpose of this study is to investigate whether TNF- α productions of mouse macrophage RAW 264.7 and human hepatocyte HepG2 are modulated by *Artemisiae argi* Folium water extract (AW), *Lactobacillus pentosus*-fermented *Artemisiae argi* Folium water extract (AFL), and *Saccharomyces cerevisiae*-fermented *Artemisiae argi* Folium water extract (AFS) for 3 h of incubation. Effect of AW on cell viability of HepG2 was also investigated. TNF- α productions were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay method and cell viability was measured by MTT assay. Both AFL and AFS significantly increased TNF- α productions of RAW 264.7 at the concentration of 50, 100, and 200 μ g/mL ($p < 0.05$). Also, AFL and AFS significantly increased TNF- α productions of HepG2 at the concentration of 50, 100, and 200 μ g/mL ($p < 0.05$). AW significantly increased TNF- α production of HepG2 at the concentration of 100 and 200 μ g/mL ($p < 0.05$). AW did not show any cytotoxicity on HepG2 cells for 3 h. These results suggest that AFL, AFS, and AW have the immune-enhancing property related with its increasing effect on TNF- α production of macrophage and hepatocyte.

Key words : *Artemisiae argi* folium, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus pentosus*, TNF- α

서 론

애엽(艾葉; *Artemisiae argi* Folium)은 국화과(Compositae; 菊花科)에 속한 여러해살이풀(多年生 草本)인 황해쭉(*Artemisia argyi* LEV. et VANT)의 잎을 건조(乾燥) 것으로, 여름에 꽃이 아직 피지 않았을 때 채취(採取)하여 쉐건(曬乾)해서 사용하는 데, 말린 상태는 거의 쭉그러져 부서져있으며 짧은 엽병(葉柄; petiole; 잎자루)이 있는 것이 특징이다¹⁾. 애엽의 완성된 상태를 잘 살펴보면 계란모양의 타원형이며 깃털모양으로 깊이 갈라져 있고 갈라진 조각은 타원상의 피침형(披針形)이며, 잎가에는 불

규칙한 거치(鋸齒)가 있고, 윗 표면은 회록색(灰綠色) 또는 짙은 황록색(黃綠色)으로 부드러운 털과 선점(腺點)이 있으며, 아래 표면에는 회백색(灰白色)의 용모(絨毛)가 촘촘히 나있고(密生) 질감이 유연(柔軟)하다¹⁾. 애엽(艾葉)의 약성(藥性)은 따뜻하나(溫) 약간의 독(小毒)이 있으며, 맵고 쓴(辛苦) 맛을 가지고 있어, 간경(肝經) · 비경(脾經) · 신경(腎經)으로 귀경(歸經)한다¹⁾. 동의보감(東醫寶鑑)에서는 애엽을 '약쭉'이라고도 하였으며 '사자발쭉'이라고도 하였고, 그 약효에 대해서는 '온갖 오래된 병과 부인의 붕루(崩漏)에 주로 쓰며, 태를 든든하게 하고(安胎) 복통(腹痛)을 멈추게 하며, 적백리(赤白痢)와 오장치(五臟痔)의 출혈을 멎게 하고, 음부의 감닉창(下部蠶)을 치료하여 새살이 돋게 하며, 풍한사를 몰리치고(辟風寒) 임신하는 것을 도와준다(令人有子)라고 하였다²⁾.

* 교신저자 : 박완수, 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학

· E-mail : hangl98@naver.com, · Tel : 031-750-8821

· 접수 : 2010/08/23 · 수정 : 2010/10/15 · 채택 : 2010/10/19

한약의 약리적 효능을 강화시키거나 맛의 변화, 혹은 한약냄새의 조절을 위해 다양한 방법이 시도되고 있으며 그중에 최근 많이 이루어지고 있는 것이 발효한약의 개발이다. 즉 단미 혹은 복합제제한약을 다양한 발효균들을 이용하여 발효시키고, 발효된 약재들을 치료에 사용하거나, 성분 및 맛과 향취의 변화를 시도하는 것이다^{3,4)}. 발효숙의 신제조법 개발이나 발효숙의 약리적 효능 증대에 대한 연구 또한 계속 이루어지고 있다^{5,9)}.

종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor-alpha; TNF- α)는 인체면역증반응의 핵심적 인자로서, 과잉배출시 염증의 악화가 유도되기도 하지만, 기본적으로 외부로부터 침입한 바이러스의 증식억제뿐만 아니라 체내에서 발생하는 각종 암세포들의 생성을 억제하는 생체항상성 유지의 필수적 역할을 담당하고 있는 것이다¹⁰⁾.

본 연구에서는 애엽(艾葉)과 애엽을 효모균의 일종인 *Saccharomyces cerevisiae*, 그리고 유산균의 일종인 *Lactobacillus pentosus*로 발효시켜 얻은 시료를 대상으로 인간간조직세포 HepG2와 마우스대식세포 RAW 264.7의 종양괴사인자-알파의 생성에 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 Tetrazolium salt 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 dimethyl sulfoxide (DMSO), 1×PBS solution 등은 Sigma사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였으며 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (NUAIRE, USA), clean bench(Jeio thec, Korea), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), research microscope(Becton dickinson, USA), centrifuge(Gyrozen, Korea), water bath(Sae Han, Korea), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), freeze dryer(Eyela), deep freezer(Ilshin Lab, Korea) microplate reader (Bio-Rad, USA), ELISA assay kit for TNF- α (Endogen, USA) 등이다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재 애엽(*Artemisiae argi Folium*)은 한국서해안에서 채취하여 검정한 후 사용하였으며 검정된 약재들은 경원대학교 한의과대학 병리학교실에 보관되었다.

2. 방법

1) 시료의 제조

애엽추출물과 발효애엽추출물의 제조는 이미 보고한 선행연구³⁻⁸⁾의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다.

(1) 애엽(艾葉) 추출물(AW) 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) 유산균발효애엽 추출물(AFL) 제조

위에서 제조된 艾葉 추출물을 이용하여 다음과 같이 유산균 발효애엽추출물(AFL)을 제조하였다.

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

② 열수출하여 건조한 艾葉 추출물(3.0 g, pH 5.44)을 screw cap tube에 담고 미리 추출된 조효소액을 2.2 mL을 첨가하여 37°C에서 2시간 효소반응하였다.

③ 효소반응 후 95°C에서 10분간 살균하였다.

④ *Lactobacillus pentosus* K34를 艾葉에 4%씩 접종하여 37°C에서 4일간 배양하였다.

⑤ 배양 후 pH는 5.42였다.

⑥ 배양 후 60°C에서 20분간 열처리한 후 동결건조하여 유산균발효애엽추출물(AFL) 제조를 완료, 실험에 사용하였다.

(3) 효모균발효애엽 추출물(AFS) 제조

위에서 제조된 艾葉 추출물을 이용하여 다음과 같이 효모균 발효애엽추출물(AFS)을 제조하였다.

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

② 열수출하여 건조한 艾葉 추출물(3.0 g, pH 5.44)을 screw cap tube에 담고 미리 추출된 조효소액을 2.2 mL을 첨가하여 37°C에서 2시간 효소반응하였다.

③ 효소반응 후 95°C에서 10분간 살균하였다.

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

⑤ 배양 후 pH는 5.55였다.

⑥ 배양 후 60°C에서 20분간 열처리한 후 동결건조하여 효모균발효애엽추출물(AFS) 제조를 완료, 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 세포주는 마우스 대식세포(mouse macrophage RAW 264.7 cell line; RAW 264.7)과 인간 간조직세포(human hepatocyte HepG2 cell line; HepG2)로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

3) 세포 배양

RAW 264.7과 HepG2는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. 세포들이 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식될 때까지 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS; Sigma, USA) 용액으로 씻어주고 새로운 배지로 갈아주었으며, 충분히 증식된 후에는 75 cm² flask 당 3 mL의 0.25 % trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하

여 세포를 탈착한 후 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양 용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

4) 세포생존을 검사

준비된 시료가 RAW 264.7에는 유의한 독성을 나타내지 않음에 대해서 이미 보고한 바³⁻⁸⁾가 있기 때문에 AW의 HepG2 세포생존율에 미치는 영향에 대해서만 MTT assay를 통하여 이미 보고한 방법³⁻⁸⁾에 따라 Mosmann 등¹¹⁻¹²⁾의 방법을 응용하여 다음과 같이 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주, 24시간동안 배양한 후, 배지에 녹인 시료(0, 10, 50, 100, 200 µg/mL)를 각 well에 처리하고 3시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 뒤, 배지를 조심스럽게 제거하고 PBS에 녹인 1 mg/mL MTT(Sigma, USA)를 각 well에 처리하고 알루미늄호일로 차광하여 2시간동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 배양액을 모두 제거하고 DMSO를 200 µL 처리한 뒤 37°C에서 60분 방치 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정, 세포생존율을 비교하였다.

5) 종양괴사인자-알파(TNF-α) 생성에 대한 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 시행

Raw 264.7과 HepG2의 TNF-α 생성과 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 다음과 같이 실험을 시행한다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 µL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 배지에 녹인 시료(0, 50, 100, 200 µg/mL)를 각 well에 처리하고 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 채취한 뒤, 'ELISA assay kit for TNF-α' 제조사에서 제시한 ELISA방법에 따라 microplate reader를 이용, 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 TNF-α 생성에 대한 시료의 영향을 비교하였다.

3. 통계처리

실험성적은 평균 ± 표준오차(Mean ± SEM)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 Student t-test로 분석하여 P<0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. AW가 HepG2 세포생존율에 미치는 영향

AW(10, 50, 100, 200 µg/mL)를 HepG2에 처리하여 3시간동안 배양한 결과 AW가 10 µg/mL의 농도에서 AW를 처리하지 않은 정상군(normal group)에 비해 106.58 ± 4.93%의 생존율을 나타내는 등 모든 농도에서 유의한 세포생존율 감소를 나타내지 않았다(data not shown).

2. AFL이 RAW 264.7의 TNF-α 생성에 미치는 영향

AFL(0, 50, 100, 200 µg/mL)이 포함된 배지에 RAW 264.7

세포들을 3시간 동안 배양한 결과 RAW 264.7의 TNF-α 생성을 AFL이 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 각각 126.2±2.36%, 127.1±3.31%, 133.2±1.91%로 모두 유의(p<0.05)하게 증가시켰다 (Fig. 1).

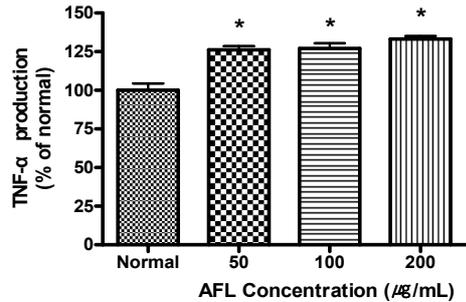


Fig. 1. Effect of AFL on TNF-α production in RAW 264.7 cells. TNF-α production from RAW 264.7 was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cells were incubated with AFL (0, 50, 100, 200 µg/mL) for 3 h. Results are represented as mean ± SEM. Nor : Normal group treated with culture medium only. * represents p < 0.05 compared to the normal.

3. AFS가 RAW 264.7의 TNF-α 생성에 미치는 영향

AFS(0, 50, 100, 200 µg/mL)가 포함된 배지에 RAW 264.7 세포들을 3시간 동안 배양한 결과 RAW 264.7의 TNF-α 생성을 AFS가 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 각각 124.5±2.86%, 131.2±3.31%, 149.4±3.48%로 모두 유의(p<0.05)하게 증가시켰다(Fig. 2).

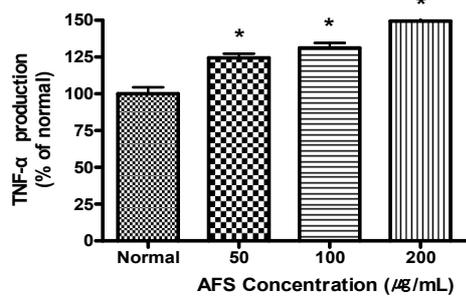


Fig. 2. Effect of AFS on TNF-α production in RAW 264.7 cells. TNF-α production from RAW 264.7 was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cells were incubated with AFS (0, 50, 100, 200 µg/mL) for 3 h. Results are represented as mean ± SEM. Nor : Normal group treated with culture medium only. * represents p < 0.05 compared to the normal.

4. AW가 HepG2의 TNF-α 생성에 미치는 영향

AW(0, 50, 100, 200 µg/mL)가 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과 HepG2의 TNF-α 생성을 AW가 100, 200 µg/mL의 농도에서 각각 131.8±1.68%, 155.2±3.35%로 유의(p<0.05)하게 증가시켰다(Fig. 3).

5. AFL이 HepG2의 TNF-α 생성에 미치는 영향

AFL(0, 50, 100, 200 µg/mL)이 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과 HepG2의 TNF-α 생성을 AFL이 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 각각 113.8±3.2%, 121.3±3.91%,

132.5±3.07%로 모두 유의(p<0.05)하게 증가시켰다(Fig. 4).

고찰

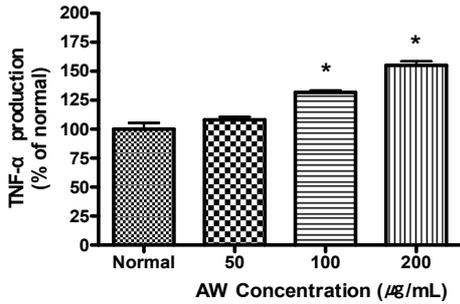


Fig. 3. Effect of AW on TNF-α production in HepG2 cells. TNF-α production from HepG2 was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cells were incubated with AW (0, 50, 100, 200 μg/mL) for 3 h. Results are represented as mean ± SEM. Nor : Normal group treated with culture medium only. * represents p < 0.05 compared to the normal.

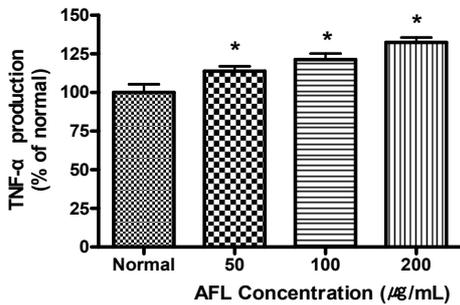


Fig. 4. Effect of AFL on TNF-α production in HepG2 cells. TNF-α production from HepG2 was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cells were incubated with AFL (0, 50, 100, 200 μg/mL) for 3 h. Results are represented as mean ± SEM. Nor : Normal group treated with culture medium only. * represents p < 0.05 compared to the normal.

6. AFS가 HepG2의 TNF-α 생성에 미치는 영향

AFS(0, 50, 100, 200 μg/mL)가 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과 HepG2의 TNF-α 생성을 AFS가 50, 100, 200 μg/mL의 농도에서 각각 122.2±5.52%, 127.1±1.51%, 156.5±3.25%로 모두 유의(p<0.05)하게 증가시켰다(Fig. 5).

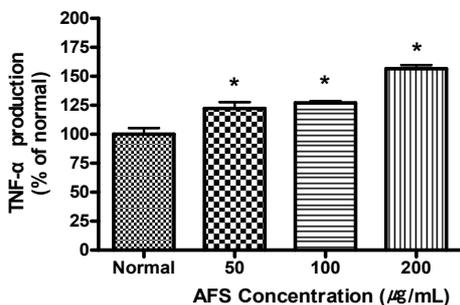


Fig. 5. Effect of AFS on TNF-α production in HepG2 cells. TNF-α production from HepG2 was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cells were incubated with AFS (0, 50, 100, 200 μg/mL) for 3 h. Results are represented as mean ± SEM. Nor : Normal group treated with culture medium only. * represents p < 0.05 compared to the normal.

에열(艾葉)은 온경지혈약(溫經止血藥)으로 분류되는데, 추운 기운을 제거하여 통증을 없애주며(散寒止痛) 경락을 따뜻하게 하여 출혈을 막는(溫經止血) 효능이 있어서 아랫배가 차가운 통증(少腹冷痛), 여성의 월경이 불규칙한 것(月經不調), 여성의 자궁기능이 약화되어 임신이 잘 안되는 경우(宮冷不孕), 피를 토하거나(吐血), 코피가 나는 것(衄血), 과도한 자궁 출혈(崩漏經多), 임신성 하혈(下血) 등에 적용될 수 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 한편, 외용질환치료에 적용되는 외용약(外用藥)으로 사용되기도 하는데 피부소양증(皮膚癢症)을 치료하기도 하며 뜸(灸)의 기본재료로서 구법(灸法)에 사용되기도 한다¹³⁾. 에열(艾葉)의 주요한 성분으로는 약리활성을 가진 플라보노이드의 일종인 cineol 등의 정유(精油)와 artemisia alcohol, β-caryophyllene, linalool, camphor, borneol, jaceosidin, scopoletin, isoscapoletin, arteminolides B·C·D, eudesmanolides 등¹³⁻¹⁶⁾이 보고된 바 있다.

인체의 항상성을 위협하는 존재 중에 세균, 바이러스, 진균들은 외부로부터 침입하는 대표적인 병원체들이며 이에 대항하여 인체를 방어하는 체계가 인체 면역증강체계이다. 즉, 인체는 면역증강방어체계를 통하여 외부로부터 침입하는 ‘나’이외의 유기체(세균, 바이러스, 진균 등)는 물론 화학물질, 독소 등을 인식하고 효과적으로 제거하며 손상된 인체조직을 복구한다. 인체의 면역증강체계가 인체항상성유지를 위하여 수행하는 또 다른 중요기능 중의 하나가 노화된 세포 및 암세포와 같은 비정상세포의 제거이다. 이러한 면역증강체계에 관여하는 세포들로는 중성구, 호염구, 호산구 등의 과립구와 B-세포, T-세포, NK세포 등의 림프구, 단핵구와 대식세포 등의 탐식세포, 그리고 그 외에 내피세포, 비만세포, 지방세포, 섬유모세포, 간세포 등이 있다. 이중 대식세포는 병원체 침입의 초기단계에 침입한 항원을 ‘침입자’로 인식하고, 림프구와 같은 인체 내의 다른 면역세포들에 적극적인 신호전달을 통하여 면역방어기능이 활성화되도록 한다^{17,18)}.

대식세포의 이러한 병원체항원(pathogenic antigen)인식에는 사이토카인(cytokine)이라는 면역증강매개인자(inflammatory mediator)의 생성이 필수적이다. 면역증강매개인자에는 인터루킨(interleukin)-1, 인터루킨-2, 인터루킨-4, 인터루킨-6, 인터루킨-8, 인터루킨-12, 인터루킨-15, 인터루킨-17, 인터루킨-23 등의 인터루킨류뿐만 아니라 인터페론유발단백질-10(interferon-inducible protein-10), 각질세포유래케모카인(keratinocyte-derived chemokine), 단핵구주화성단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1)과 같은 케모카인(chemokine), 그리고 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor), 대식세포집락자극인자(macrophage-colony stimulating factor), 과립구집락자극인자(granulocyte-colony stimulating factor)와 같은 성장인자(growth factor)가 포함되며 사이토카인 중 대표적인 것이 중앙괴사인자-알파(TNF-α)이다. 이름에서 알 수 있듯이 중앙괴사인자-알파는 특히 중앙세포의 괴사를 유도하는 기능이 있으며 외부로부터 침입한 병원체의 활동억제, 바이러스의 복제방해작용을 통하여 인체가 항상성을 유

지하고 면역력을 갖도록 해준다¹⁰⁾. 그러므로 재조합 종양괴사인자(recombinant TNF)는 면역력이 떨어진 상태의 환자에게 면역강화제로서 투여되기도 한다. 또한 종양괴사인자는 병원체감염의 초기에 일어나는 급성기반응(acute phase response)에서 간조직세포에 작용하여 C-반응성단백질(C-reactive protein) 등 다양한 급성기반응관련인자들(acute phase reactants)의 생성을 유도하여 면역염증반응을 조절하는 역할도 한다. 물론 다른 사이토카인이나 성장인자처럼 종양괴사인자의 과도한 면역염증작용은 급성성의 염증질환이나 패혈증 속(Septic Shock)을 유발하여 인체 자체에 위해성을 발휘하기도 한다. 종양괴사인자알파 이외에 종양괴사인자베타(TNF-β)도 주요한 종양괴사인자류(TNF family)이다. 이러한 종양괴사인자는 대식세포에 의해서 주로 생성, 배출되지만 그 외에도 림프구(lymphocyte), 내피세포(endothelial cell), 섬유아세포(fibroblast), 비만세포(mast cell), 심근세포(cardiomyocyte), 지방세포(adipocyte) 등에 의해서도 생성된다.

면역염증세포와 관련된 애엽과 발효애엽의 약리효능에 대한 연구로 본 연구팀은 이미 본보를 통하여 애엽물추출물이 마우스 대식세포 RAW 264.7에 독성을 유발하지 않으면서 종양괴사인자-알파의 생성을 증가시킴을 보고한 바⁷⁾ 있으며, 효모균발효애엽물추출물과 유산균발효애엽물추출물이 RAW 264.7과 HepG2에 대해서 세포독성을 일으키지 않음에 대해서도 이미 보고⁸⁾된 바 있다.

본 연구에서 AW(0, 10, 50, 100, 200 µg/mL)를 HepG2에 처리하여 3시간동안 배양한 결과 AW가 10 µg/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 세포생존율 감소를 나타내지 않았으며, AFL이 포함된 배지에 RAW 264.7 세포들을 3시간 동안 배양한 결과 RAW 264.7의 TNF-α 생성을 AFL이 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의하게 증가시켰고, AFS가 포함된 배지에 RAW 264.7 세포들을 3시간 동안 배양한 결과에서도 RAW 264.7의 TNF-α 생성을 AFS가 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의하게 증가시킨 것으로 나타났으며, AW가 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과 HepG2의 TNF-α 생성을 AW가 100, 200 µg/mL의 농도에서 유의하게 증가시켰고, AFL이 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과에서도 HepG2의 TNF-α 생성을 AFL이 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의하게 증가시켰으며, AFS가 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과에서도 HepG2의 TNF-α 생성을 AFS가 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의하게 증가시켰다. 이와 같이 HepG2의 TNF-α 생성에 대해 AW는 50 µg/mL의 농도에서 유의한 증가를 나타내지 않았으나 AFL과 AFS는 50 µg/mL의 농도에서 모두 유의한 증가를 나타내는 것은 애엽을 효모균이나 유산균으로 발효하는 것이 HepG2의 TNF-α 생성증가를 통한 면역기능강화에 더 유리할 수 있음을 의미한다.

이러한 실험결과는 애엽, 유산균발효애엽, 효모균발효애엽의 물추출물이 세포독성을 나타내지 않으면서도 마우스대식세포와 인간간조직세포의 종양괴사인자-알파의 생성을 증가시킴으로써 면역염증체계를 통한 인체 방어 및 항상성유지활동을 도와주는 작용을 가지고 있는 것으로 해석될 수 있다. 또한 환약을 유

산균이나 효모균으로 발효시켜 얻을 수 있는 유의성 획득을 위해 애엽을 발효하는 것이 애엽 본래의 TNF-α 생성증가능을 훼손시키지 않는 것으로도 이해될 수 있다. 앞으로 애엽과 발효애엽을 이용한 인체면역기능강화제 개발을 위해 보다 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 애엽물추출물(AW), 유산균발효애엽물추출물(AFL), 효모균발효애엽물추출물(AFS)이 마우스 대식세포 RAW 264.7과 인간간조직세포 HepG2의 종양괴사인자-알파 생성에 미치는 영향을 알아보기 위한 in vitro 실험을 수행한 결과 다음을 알 수 있었다.

본 연구에서 AW(0, 10, 50, 100, 200 µg/mL)를 HepG2에 처리하여 3시간동안 배양한 결과 AW가 10 µg/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 세포생존율 감소를 나타내지 않았으며, AFL이 포함된 배지에 RAW 264.7 세포들을 3시간 동안 배양한 결과 RAW 264.7의 TNF-α 생성을 AFL이 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의하게 증가시켰고, AFS가 포함된 배지에 RAW 264.7 세포들을 3시간 동안 배양한 결과에서도 RAW 264.7의 TNF-α 생성을 AFS가 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의하게 증가시킨 것으로 나타났으며, AW가 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과 HepG2의 TNF-α 생성을 AW가 100, 200 µg/mL의 농도에서 유의하게 증가시켰고, AFL이 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과에서도 HepG2의 TNF-α 생성을 AFL이 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의하게 증가시켰으며, AFS가 포함된 배지에 HepG2 세포들을 3시간 동안 배양한 결과에서도 HepG2의 TNF-α 생성을 AFS가 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 모두 유의하게 증가시켰다. 이러한 실험결과는 애엽, 유산균발효애엽, 효모균발효애엽의 물추출물이 세포독성을 나타내지 않으면서도 마우스대식세포와 인간간조직세포의 종양괴사인자-알파의 생성을 증가시킴으로써 면역염증체계를 통한 인체 방어 및 항상성유지활동을 도와주는 작용을 가지고 있는 것으로 해석될 수 있다. 앞으로 애엽과 발효애엽을 이용한 인체면역기능강화제 개발을 위해 보다 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2010-0022919) 및 2010년도 경원대학교 연구비지원에 의하여 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, pp 405-407, 1991.
2. 허 준. 대역동의보감. 하동, 동의보감출판사, p 2180, 2005.

3. 박완수. Gallic acid 등으로 유발된 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 유산균발효애엽 추출물의 영향. 동의생리병리학회지 23(2):438-442, 2009.
4. 박완수, 김도훈. 고삼과 애엽의 발효 혼합물이 에탄올과 니코틴으로 유발된 마우스 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성 감소에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 22(5):1293-1298, 2008.
5. 박완수. EtOH 등의 독성물질에 대한 효모균발효애엽 추출물의 간세포보호효과. 동의생리병리학회지 24(2):284-289, 2010.
6. 박완수. EtOH 등의 독성물질에 대한 유산균발효애엽 추출물의 간세포보호효과. 동의생리병리학회지 24(3):457-462, 2010.
7. 박완수. 마우스 대식세포(RAW 264.7)에 대한 艾葉 물추출물의 생리활성 연구. 동의생리병리학회지 22(4):815-820, 2008.
8. 한효상. 애엽 발효 추출물의 세포독성과 면역활성에 관한 연구. 경원대학교 대학원 박사학위논문, 2008.
9. 조수인, 김형우, 이근지. 동백 발효 추출물 단기 투여의 활성화에 대한 연구. 대한본초학회지 21(2):55-62, 2006.
10. Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 104(4):487-501, 2001.
11. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 65(1-2):55-63, 1983.
12. Yoon, S.B., Lee, Y.J., Park, S.K., Kim, H.C., Bae, H., Kim, H.M., Ko, S.G., Choi, H.Y., Oh, M.S., Park, W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. J Ethnopharmacol. 125(2):286-290, 2009.
13. 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 NY Acad Sci. 1095: 483-495, 2007.
14. 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 NY Acad Sci. 1095: 458-466, 2007.
15. 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.
16. 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.
17. Ryan, J.G., Kastner, D.L. Fevers, genes, and innate immunity. Curr Top Microbiol Immunol. 321: 169-184, 2008.
18. Bennett, M.K., Kirk, C.J. Development of proteasome inhibitors in oncology and autoimmune diseases. Curr Opin Drug Discov Devel. 11: 616-625, 2008.