

## 발효 魚腥草 물추출물의 마우스 대식세포 항염활성 연구

이지영, 이영종, 박완수\*

경원대학교 한의과대학

### Anti-inflammatory Effects of Fermented *Houttuyniae Herba* Water Extract on LPS-induced Mouse Macrophage

Ji-Young Lee, Young-Jong Lee, Wan-Su Park\*

College of Oriental Medicine, Kyungwon University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study is to investigate the effect of Fermented *Houttuyniae Herba* Water Extract (HL) on production of proinflammatory mediators in mouse macrophage RAW 264,7 cells.

**Methods** : Cell viabilities were measured by MTT assay. Effect of HL on nitric oxide (NO) production from RAW 264,7 cells was accessed by Griess reagent assay. Effect of HL on productions of inflammatory cytokines such as interleukine (IL)-17, Interferon  $\gamma$  -inducible protein (IP)-10, Eotaxin, IL-5, Monocyte Chemotactic Protein-3 (MCP-3), and IL-13 in LPS-induced RAW 264,7 cells was accessed by a multiplex bead array assay based on xMAP technology.

**Results** : The results of the experiment are as follows.

1. Incubation with HL for 24 hours showed significant increase in cell viability of RAW 264,7 mouse macrophages ( $P < 0.05$ ).
2. HL showed to inhibit NO production from RAW 264,7 cells at the concentrations of 25 and 50 ug/mL significantly ( $P < 0.05$ ).
3. HL inhibited significantly NO production in LPS-induced RAW 264,7 cells at the concentrations of 25, 50, 100 and 200 ug/mL ( $P < 0.05$ ).
4. HL inhibited significantly IL-17, IP-10 and Eotaxin in LPS-induced RAW 264,7 cells at the concentrations of 25, 50, 100 and 200 ug/mL ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** : These results suggest that HL has anti-inflammatory moiety related with its inhibition of NO, IL-17, IP-10, and Eotaxin in macrophages.

**Key words** : *Houttuyniae Herba*, Macrophage, Nitric oxide, IL-17, Eotaxin, IP-10.

## 서론

최근 한의학계에서는 새로운 약재개발의 한 방법인 발효한약에 대한 관심이 증가하고 있다. 발효법이란 약물을 일정한 처리를 거친 후 일정 온도와 습도의 조건하에서 미생물의 촉매 분해 작용에 의해 약물을 발효시키는 방법으로, 한약에 따라 일정한 방법을 채용한 후 온도와 습도가 적합한 환경에서 발효를 진행하게 된다<sup>1)</sup>. 발효를 통해 장내에서 흡수될 수 없는 배당체 성분에서 비배당체로의 생물전환이 가능하며<sup>2)</sup>, 이로 인하여 약리성분의 체내 흡수율 및 생체이용률이 강화된다.

현재 발효법을 이용한 한약으로는 神麴, 淡豆豉, 紅麴 등이 있으며, 장내세균을 이용한 발효 한약에 대한 연구<sup>3-4)</sup>가 진행되고 있어 다양한 형태의 발효 한약의 개발이 기대되고 있다.

魚腥草는 삼백초과(三白草科: *Sacururaceae*)에 속하는 일년생 본초인 약모밀 *Houttuynia cordata* Thunb.의 지상부로서, 여름철에 가지와 잎이 무성하고 꽃 이삭이 많을 때 채취하여 햇볕에 말려 사용<sup>5)</sup>하는 한약재의 일종이다. 열을 내리고 解毒하며利尿하고 부기를 가라앉히는 효능이 있어 肺炎, 肺膿瘍, 말라리아, 水腫, 癰腫, 濕疹 등을 치료한다. 《本草綱目》에서는 熱毒癰腫, 痔疾 脫肛을 치료하고 疴疾(熱은 있지만 惡寒은

\*교신저자 : 박완수, 경기도 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학 병리학교실.  
· Tel / Fax : 031-750-8821, · E-mail : hangl98@naver.com.  
· 접수 : 2010년 8월 5일 · 수정 : 2010년 8월 31일 · 채택 : 2010년 9월 13일

없는 瘧疾의 일종)을 치료하며 飭의 中毒을 풀어준다<sup>6)</sup>고 하였으며 《滇南本草》에는 肺癰腫으로 인한 咳嗽에 血膿이 나오는 증상, 痰에서 비린내와 악취가 나는 증상, 大腸 熱毒, 痔疾을 치료 한다<sup>6)</sup>고 하였다.

전초에는 정유가 함유되어 있고, 그 중에는 항균성분인 decanoyl acetaldehyde, mehyl-n-nonylketone, myrcene, lauric aldehyde, capric aldehyde, capric acid 등이 함유되어 있다<sup>5)</sup>. 魚腥草의 주요 생리활성물질인 puerctrin은 강심작용, 지속적 혈관수축작용, 각종 장내세균 및 사상균에 대한 항균작용, 항바이러스작용, 자연 살해 세포의 활성화, 폐렴 유발에 대한 면역기능 증강효과 및 항종양효과 등이 있다고 보고<sup>8-9)</sup>되고 있다. 면역과 관련된 연구로는 魚腥草가 마우스 대식세포의 항체 생성능을 증진시키고 인체 면역세포의 증식을 향상시킨다는 보고<sup>10)</sup>가 있고, 비만세포에서 히스타민을 유리시켜 알레르기 반응을 유발하는 Compound 48/80의 복강내 주사에 의해 유발되는 전신성 아나필락시 쇼크를 억제한다는 항염증에 대한 보고<sup>11)</sup>, 魚腥草 추출물에서 분리된 렉틴(lectin) 성분이 사람의 B 림프구와 T 림프구의 활성을 증가시킨다는 보고<sup>12)</sup>가 있으며, 魚腥草 열수 추출물을 마우스에 경구투여 하였을 때 비장세포의 증식을 유도하고 복강 대식세포를 활성화시켜 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 분비를 촉진하는 효과가 보고<sup>13)</sup>되고 있다. 또한 魚腥草를 함유한 차가버섯 발효 조성물이 위암세포와 대장암 세포의 생육을 억제 한다<sup>14)</sup>는 보고가 있으나 발효 魚腥草 추출물을 이용한 다양한 면역 활성화나 항염 효능에 대한 연구가 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 발효 魚腥草 물 추출물이 마우스 대식세포에 미치는 면역 활성을 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 Lipopolysaccharide(LPS), Tetrazolium salt 3,[4,5-dime-thylthiazol-2-yl]-2,5-dyphenyl tetrazolium bromide(MTT)와 Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Griess reagent 등은 Sigma사(ST, Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, Bio-Plex Cytokine assay kit (Bio-Rad, USA), Procarta Cytokine assay kit (Panomics, USA)을 사용하였으며 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, Japan), freeze dryer(Eyela, Tokyo, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Nuaire, USA), clean bench (Jeio thec, Korea), microplate reader 680 (Bio-Rad, USA), bio-plex 200 (Bio-Rad, USA) 등이다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 약재 魚腥草(Houttuyniae Herba)는 한국 경북 영천에서 생산된 것을 구입하여 검정한 후 사용하였으며, 검정된 약재들은 경원대학교 한의과대학 본초학교실에 보관하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료의 제조

#### (1) 발효 魚腥草 제조

魚腥草(Houttuyniae Herba) 50 g에 조효소제인 a-herbzyme(한국효소, 화성, 한국) 4 g을 넣고 유산균(Lactic acid bacteria)을 접종하여 37°C에서 3일간 배양하여 발효가 충분히 이루어지도록 하였다.

#### (2) 발효 魚腥草 물 추출물(HL) 제조

발효 魚腥草 10 g을 전기약탕기에 1차 증류수 1,000 mL와 함께 넣은 뒤 150분 동안 가열, 추출하였다. 추출액을 filter paper로 감압 여과한 뒤, 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용, 건조하여 3.22 g(수득률 32.2%)의 발효 魚腥草 물 추출물(Water Extract of Fermented Houttuyniae Herba; HL)을 얻어 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 ug/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells은 75cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후, 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하고 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) 세포생존을 검사(Cell viability assay)

준비된 시료가 RAW 264.7 cells의 세포생존율(cell viability)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한다. 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well의 cell을 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어준다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료(25, 50, 100, 200 ug/mL)를 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양한다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 20  $\mu$ l씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양한다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100  $\mu$ l 처리하고 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

5) Nitric oxide(NO) 저해활성 측정

RAW 264.7 cell line으로부터 생성되는 nitric oxide의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 nitric oxide를 griess 시약을 이용하여 다음과 같이 측정한다. 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL의 cell을  $100 \mu\text{L}$ 씩 넣고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을  $1 \times \text{PBS}$  용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ ) 단독 혹은 배지에 녹인 시료(25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ )와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액을  $100 \mu\text{L}$ 을 채취하여 griess시약  $100 \mu\text{L}$ 을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정한다.

6) 면역단백질(cytokines)에 대한 Multiplex bead-based cytokine assay

면역단백질 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Politch 등<sup>15-16)</sup>을 참조하여 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL의 cell을  $100 \mu\text{L}$ 씩 넣고  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  Incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을  $1 \times \text{PBS}$  용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS를 단독처리( $1 \mu\text{g/mL}$ )하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ )와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액(cell culture supernatant)을 채취하여 Filter plate(96 well type)에 미리 준비되어 있던 antibody-conjugated Capture Beads와 결합시킨다. 결합된 Capture Beads가 담긴 Filter plate의 각 well을  $150 \mu\text{L}$ 의 Wash buffer로 세척한다. 세척이 끝난 뒤 각 well에 detection antibody를 추가한 후 30분간 배양한다. 배양이 끝나면 Wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 Streptavidin-PE를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 30분간 진동배양(shaking)한다. 배양이 끝나면 Wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에  $120 \mu\text{L}$ 의 Reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5분간 진동배양(shaking)한 후 Bio-Plex array reader(Bio-Plex 200)을 이용, 측정코자 하는 cytokine의 양을 조사비교한다.

3. 통계처리

실험성적은 평균치  $\pm$  표준오차 (Mean  $\pm$  SEM)로 나타내며, 대조군과 각 실험군의 평균 차이는 ANOVA test와 Student *t*-test로 분석하여  $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정한다.

결 과

1. HL이 RAW 264.7 세포의 세포생존율에 미치는 영향

HL이 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay 방법으로 조사하였다. HL을 24 시간 처리한 결과 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 세포생존율은 각각  $94.50 \pm 2.08\%$ ,  $95.00 \pm 2.19\%$ ,  $94.81 \pm 2.17\%$ ,  $98.86 \pm 2.61\%$  로 25  $\mu\text{g/mL}$  이상의 모든 농도에서 유의한 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

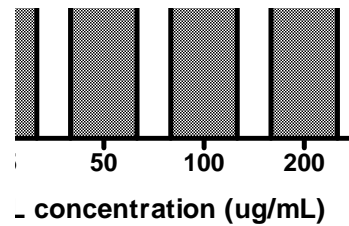


Fig. 1. Effect of HL on viability of RAW 264.7 mouse macrophage cells.

HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL. \* represents  $P < 0.05$  compared to the normal.

2. NO 생성에 대한 영향

HL이 RAW 264.7 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. HL을 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  농도로 24시간 처리하였을 때 NO의 생성량은 각각  $94.09 \pm 3.74\%$ ,  $93.83 \pm 2.42\%$ ,  $97.69 \pm 0.82\%$ ,  $98.46 \pm 1.54\%$  로 25  $\mu\text{g/mL}$ 과 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의하게 감소하였다(Fig. 2.).

HL이 LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )로 유발된 RAW 264.7 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 각각  $81.89 \pm 5.04\%$ ,  $81.94 \pm 5.10\%$ ,  $83.80 \pm 3.60\%$ ,  $83.80 \pm 3.70\%$ 로 25  $\mu\text{g/mL}$  이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 3.).

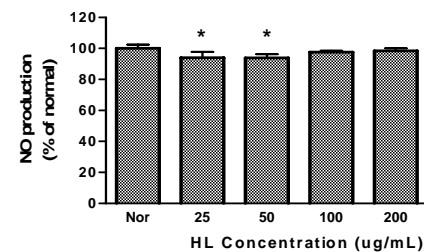


Fig. 2. Effect of HL on NO production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation.

HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL. \* represents  $P < 0.05$  compared to the normal.

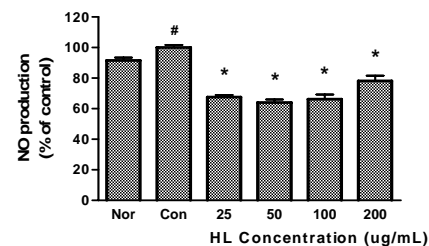


Fig. 3. Effect of HL on NO production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL. Control : Treated with LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

### 3. Cytokine 생성에 대한 영향

#### 1) Interleukin(IL)-17 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 IL-17 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 25 ug/ml, 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL 농도에서 각각  $3.90 \pm 1.93$  pg/mL,  $3.60 \pm 0.95$  pg/mL,  $2.80 \pm 0.96$  pg/mL,  $3.80 \pm 1.50$  pg/mL 로 25 ug/ml 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-17 생성증가를 대조군(control:  $8.30 \pm 1.89$  ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰다(Fig. 4.).

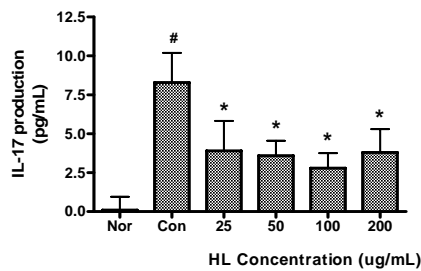


Fig. 4. Effect of HL on IL-17 production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

#### 2) Eotaxin 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 Eotaxin 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 25 ug/ml, 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL 농도에서 각각  $77.50 \pm 9.88$  pg/mL,  $77.60 \pm 10.83$  pg/mL,  $64.50 \pm 4.65$  pg/mL,  $77.80 \pm 9.98$  pg/mL 로 25 ug/ml 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 Eotaxin 생성증가를 대조군(control:  $117.60 \pm 9.84$  ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰다(Fig. 5.).

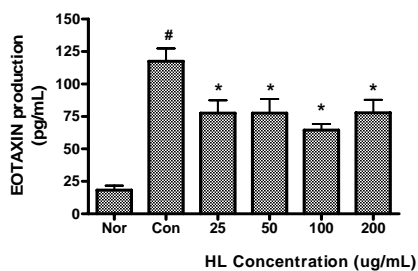


Fig. 5. Effect of HL on Eotaxin production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control

#### 3) Interferon r-inducible protein (IP)-10 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 IP-10 생성에

미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 25 ug/ml, 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL 농도에서 각각  $21.00 \pm 4.97$  pg/mL,  $28.50 \pm 7.22$  pg/mL,  $22.40 \pm 5.22$  pg/mL,  $24.50 \pm 3.32$  pg/mL 로 25 ug/ml 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IP-10 생성증가를 대조군(control:  $104.30 \pm 6.60$  ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰다(Fig. 6.).

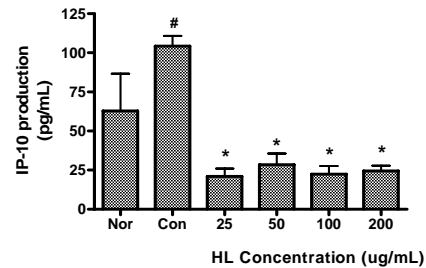


Fig. 6. Effect of HL on IP-10 production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

#### 4) Interleukin(IL)-5 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 IL-5 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 100 ug/mL, 200 ug/mL의 농도에서 각각  $6.00 \pm 0.29$  pg/mL,  $6.50 \pm 0.25$  pg/mL 로 LPS에 의한 IL-5 생성증가를 대조군(control:  $7.30 \pm 0.48$  ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰다(Fig. 7.).

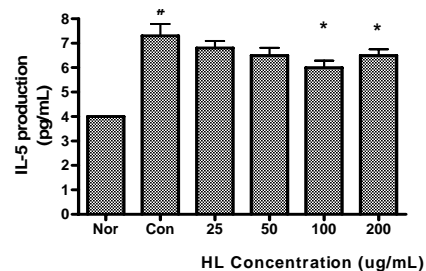


Fig. 7. Effect of HL on IL-5 production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

#### 5) Monocyte Chemotactic Protein-3 (MCP-3) 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 MCP-3 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 100 ug/mL, 200 ug/mL의 농도에서 각각  $15638.30 \pm 482.77$  pg/mL,  $15497.80 \pm 210.21$  pg/mL 로 LPS에 의한 MCP-3 생성증가를 대조군(control:  $16214.10 \pm 334.69$  ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰다(Fig. 8.).

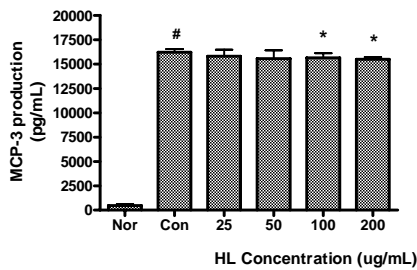


Fig. 8. Effect of HL on MCP-3 production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

6) Interleukin(IL)-13 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 IL-13 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 169,90±7.92 pg/mL로 LPS에 의한 IL-13 생성증가를 대조군(control: 179,80±5,80 ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰으나 다른 농도에서는 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 9.).

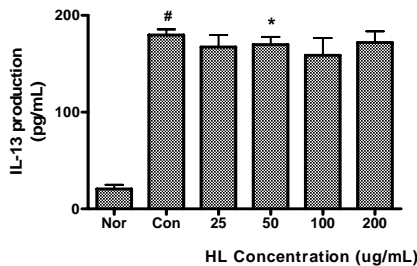


Fig. 9. Effect of HL on IL-13 production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

7) Interleukin(IL)-3 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 IL-3 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL의 농도에서 각각 2,10±0,13 pg/mL, 2,50±0,29 pg/mL, 2,00±0,00 pg/mL으로 LPS에 의한 IL-3 생성증가를 대조군(control: 3,50±0,50 ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰다(Fig. 10.).

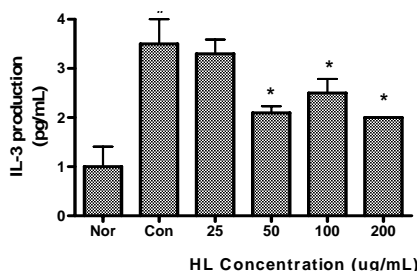


Fig. 10. Effect of HL on IL-3 production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

8) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 G-CSF 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 50 ug/mL, 200 ug/mL의 농도에서 각각 15113,30±296,82 pg/mL, 14855,60±44,33 pg/mL으로 LPS에 의한 G-CSF 생성증가를 대조군(control: 15429,40±147,96 ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰으나 다른 농도에서는 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 11.).

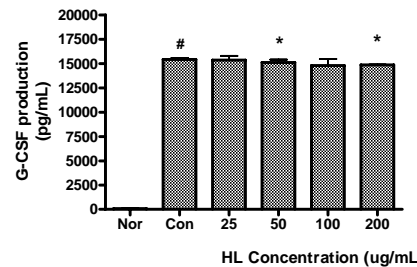


Fig. 11. Effect of HL on G-CSF production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

9) Interleukin(IL)-23p19 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 IL-23p19 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 100 ug/mL의 농도에서 37,30±2,75 pg/mL으로 LPS에 의한 IL-23p19 생성증가를 대조군(control: 43,90±1,65 ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰으나 다른 농도에서는 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 12.).

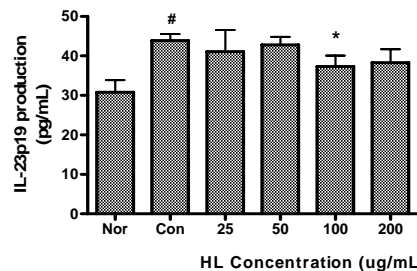


Fig. 12. Effect of HL on IL-23p19 production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean±SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1 ug/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

10) Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서  $1839.90 \pm 138.46$  pg/mL으로 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성증가를 대조군(control:  $2257.00 \pm 93.66$  ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰으나 다른 농도에서는 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 13.).

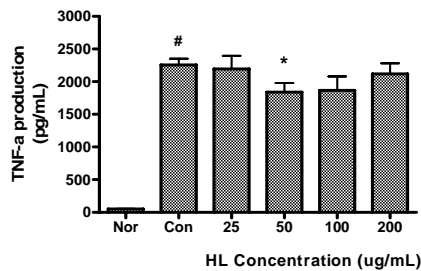


Fig. 13. Effect of HL on TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean $\pm$ SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1  $\mu$ g/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

11) Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha(MIP-1 $\alpha$ ) 생성에 대한 영향

HL이 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포의 MIP-1 $\alpha$  생성에 미치는 영향을 비교하였다. 24 시간 동안 처리한 결과 25 ug/mL의 농도에서  $10493.60 \pm 383.97$  pg/mL으로 LPS에 의한 MIP-1 $\alpha$  생성증가를 대조군(control:  $10731.60 \pm 285.17$  ug/mL)과 비교하여 유의하게 억제시켰으나 다른 농도에서는 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 14.).

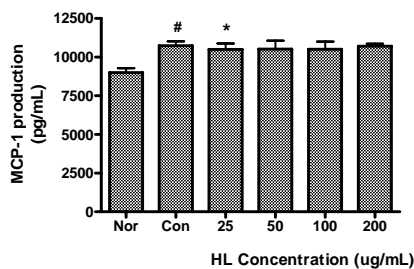


Fig. 14. Effect of HL on MIP-1 $\alpha$  production in RAW 264.7 cells for 24 h incubation with LPS. HL : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated with HL (25, 50, 100, 200 ug/mL) for 24 h. Results are represented as mean $\pm$ SEM of the three independent experiments. Normal : Not treated with HL, Control : Treated with LPS (1  $\mu$ g/mL) only. # represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the control.

## 고찰

淸熱解毒藥에 속하는 魚腥草(Houttuyniae Herba)는 삼백초과의 일년생 초본인 약모밀(*Houttuynia cordata* Thunb.)의 지상부로 여름철에 莖葉이 무성하고 花穗가 많을 때 잘라서 햇볕에 말려서 사용하는 것이다. 性은 微寒하고, 味는 辛하다. 肺經으로 歸經하며 淸熱解毒, 消癰排膿, 利尿通淋하는

효능이 있어서 肺癰吐膿, 痰熱喘咳, 熱痢, 熱淋, 癰腫瘡毒 등을 치료한다<sup>5)</sup>. 주요한 성분은 정유와 flavonoids이다. 정유 중에는 aldehyde, ketone계 화합물이 유효성분이며 魚腥草 특유의 향을 내는 성분인 decanoyl acetaldehyde와 lauraldehyde 등이 있고, 그 외 2-undecanone, myrcene, *d*-limonene 등이 함유되어 있다. 또한 魚腥草에는 quercetrin, quercitrin 등의 flavonoids와 linolenic acid, KCl 등이 함유되어 있는데 항균, 항바이러스 작용, 소염 작용, 이노 작용, 항암 작용<sup>17)</sup> 등이 알려져 있다.

본 연구에서는 인체 면역체계에 있어 중요한 역할을 담당하는 대식세포의 면역 활성화와 관련하여 HL이 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포의 생존율, NO, Cytokine의 생성에 대한 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

HL이 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 비교한 결과 HL을 24 시간 동안 처리했을 때 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 독성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 1).

최근에 세포사이의 작용을 매개하는 메신저 물질로 중요한 연구 대상이 되고 있는 nitric oxide(NO)는 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의하여 arginine으로부터 합성되며, NOS는 nNOS, eNOS, iNOS로 구성되어 있다<sup>18)</sup>. iNOS는 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 농도에 비의존성이며 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포 간세포와 심근세포 등 여러 세포에서 LPS, INF- $\gamma$ , IL-1과 TNF- $\alpha$  등의 자극에 의해 활성화되어 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다<sup>19)</sup>. NO는 중추신경계통, 말초신경계통, 심장혈관계통에서 작용을 나타냄이 보고되어 왔는데, 1990년 초에 동물 세포에서 세포간의 메신저로서 생성된다는 것을 발견하였고, 혈압, platelet adhesion, neutrophil의 집성뿐만 아니라 뇌에서 synaptic plasticity의 역할과 관련이 있을 것으로 보고되어졌다. 즉 NO는 혈소판 내에서 혈소판의 응집을 억제하며 대식세포에서 세포독성을 매개하는 작용을 하며 일부 인체조직에서는 혈관확장을 매개하는 물질로도 알려져 있다<sup>20)</sup>. 이 NO가 적게 만들어지면 고혈압, 성교불능, 동맥경화 등의 증상을 나타내고 균에 감염되기 쉽다. 반면 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다<sup>19)</sup>. HL이 RAW 264.7 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 비교한 결과 24시간 처리하였을 때 25 ug/mL과 50 ug/mL의 농도에서 유의하게 감소하였다(Fig. 2.). 또한 LPS(1 ug/mL)로 유발된 RAW 264.7 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 비교한 결과 24 시간 동안 처리하였을 때 25 ug/ml 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게 억제시켰다(Fig. 3.). 이와 같이 HL이 LPS에 의해 유발된 RAW 264.7 세포의 NO 생성증가를 억제함은 HL이 NO 과잉 생성으로 인한 염증악화를 억제할 수 있는 효능이 있음을 의미한다.

Cytokine은 당단백질로서 아주 미량으로 효과를 발휘하며, 세포의 receptor에 결합하여 그 결합에 의한 세포내 활성화 기구가 개입되어 효과를 발휘한다. cytokine은 표적세포 특이성을 나타내며 생성세포로부터의 방출은 feedback 조절의 control하에 있는 호르몬과 유사한 특성이 있으나, 혈액중이나 혈청중이 아닌 국소에서 주로 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한 각 cytokine은 일반적으로 복수의 작용을 나타내며,

다른 cytokine이 같은 활성을 나타내는 경우가 적지 않아 각 cytokine의 작용은 각각 독립된 작용임과 동시에 서로 관련을 갖는 연쇄반응이다<sup>21)</sup>. Cytokine 생성에 대한 영향을 비교한 결과 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포에 HL을 24 시간 동안 처리하였을 때 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 IL-17(Fig. 4.), Eotaxin(Fig. 5.), IP-10(Fig. 6.)의 생성증가를 유의하게 억제시켰다. IL-17은 결합 조직 세포에 작용하는 memory T-cell-derived cytokine으로, 염증매개 인자의 생산을 촉진시키며<sup>22)</sup>, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 천식과 다른 만성 질환의 혈장과 조직에서 증가하는 경향이 있다<sup>23-25)</sup>. IP-10은 CXC chemokine family의 하나로 다양한 염증세포를 염증 부위로 불러들일 뿐 아니라 Th1 lymphocyte, NK cell, macrophage와 같은 leukocyte에서 CXCR3 receptor에 연결시키는 기능을 하며<sup>26-27)</sup>, 최근 연구 보고에 의하면 IP-10은 여러 호흡기질환과 관련되는데 폐 내로 염증을 유입시키는데 중요한 역할을 한다<sup>28-29)</sup>. Eotaxin은 기니피그의 폐 조직에서 추출한 mRNA로부터 처음으로 분리되었고<sup>30)</sup>, 이것으로부터 발현시킨 단백질로 기니피그의 기관지와 피부조직을 자극 시켰을 때에 이들 조직에 호산구가 선별적으로 침윤됨을 관찰하여 이를 'eotaxin'이라 명명한 후 현재는 murine과 human eotaxin<sup>31)</sup>도 모두 밝혀져 있다. 항원 유발에 의한 eotaxin 생산증가는 조직 내 호산구증을 특징으로 하는 염증성 질환에서 중요한 역할을 한다고 제시되어 왔다<sup>32)</sup>.

이 밖에도 HL이 LPS에 의해 유발된 IL-3의 생성증가를 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제하였으며, IL-5와 MCP-3의 생성증가는 100 ug/mL, 200 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제하였고, G-CSF의 생성증가는 50 ug/mL, 200 ug/mL에서, IL-13의 생성증가는 50 ug/mL, IL-23p19의 생성증가는 100 ug/mL, TNF- $\alpha$ 의 생성증가는 50 ug/mL, MIP-1 $\alpha$ 의 생성증가는 25 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제시켰다.

이상의 결과, 발효 魚腥草를 열수 추출하여 제조한 시료 HL은 대식세포에 세포독성을 유발하지 않으면서 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포의 NO, IL-17, IP-10, Eotaxin 등의 생성을 유의하게 억제하는 것은 HL이 대식세포의 cytokine 과잉생성으로 인하여 유발될 수 있는 각종의 급·만성 염증성 질환발생과 염증현상의 악화를 완화할 수 있는 효과가 있음을 의미한다.

## 결 론

발효 魚腥草를 열수 추출하여 제조한 시료(HL)를 대상으로 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포의 세포생존율과 NO 생성, 그리고 LPS에 의해 유발된 마우스 RAW 264.7 cells의 NO, IL-17, IP-10, Eotaxin 생성증가에 미치는 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 발효 魚腥草 물추출물은 RAW 264.7 세포와 24 시간 동안 함께 배양한 후 MTT assay를 수행한 결과 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 유의하게 독성이 없는 것으로 나타났다.

2. 발효 魚腥草 물추출물은 RAW 264.7 세포와 24 시간의 배양에서 대식세포의 NO 생성을 25, 50 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제시켰으며, LPS로 유발된 NO의 생성증가를 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 유의하게 억제시켰다.

3. 발효 魚腥草 물추출물은 LPS에 의해서 유발된 RAW 264.7 세포의 IL-17, IP-10, Eotaxin 생성증가를 25 ug/mL 이상의 모든 농도에서 유의하게 억제시켰다.

이상의 결과, 발효 魚腥草를 열수 추출하여 제조한 시료 HL은 대식세포에 세포독성을 유발하지 않으면서 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포의 NO, IL-17, IP-10, Eotaxin 등의 생성을 유의하게 억제하는 것은 HL이 대식세포의 cytokine 과잉생성으로 인하여 유발될 수 있는 각종의 급·만성 염증성 질환발생과 염증현상의 악화를 완화할 수 있는 효과가 있음을 의미한다. 향후 면역매개인자와 관련된 다양한 면역질환의 치료제 개발을 위하여 발효 魚腥草 물추출물(HL)에 대한 보다 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2010년도 경원대학교 연구비지원에 의하여 수행된 연구결과입니다.

## 참고문헌

1. 박정현, 김호준, 이명중. 비만에서 장내 미생물 균총의 역할과 발효 한약의 활용. 한방비만학회지. 2009;9(1): 1-14.
2. Bae EA, Han MJ, Kim EJ, Kim DH. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. Arch Pharm Res. 2004;27:61-7.
3. 함성호, 임병락, 유가화, 가선오, 박병현. 발효에 의한 오가피의 항당뇨 활성 촉진. 동의생리병리학회지. 2008;22(2):340-5.
4. 서성숙, 정승기. 발효 금은화의 인플루엔자 바이러스 A형에 대한 저해효과. 대한한방내과학회지. 2009;30(3):465-480.
5. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2007;270-1.
6. 김창민 외. 중약대사전. 6권. 서울:정담. 1998;2888-2892.
7. Yoo HT, Noh JS, Lim YD. Hyangyak Jipsungbang. Seoul:Haenglim Publishing Co. 1977;717.
8. Wang YS, Jungyi Yakli Yo Ungyong. Peking:People's Sanitation Publishing Co. 1983;709.
9. Kansun Shinuihakwon. Great Chinese medical dictionary. Shanghai:Shanghai Science and Technology Publisher. 1978;1439.

10. Kim HJ. Biological effects of *Houttuynia cordata* Thunb extract on murine and human immune system. *MS Thesis*. Seoul National University, 2000.
11. Rho BG, Shin MK, Song HJ. Studies on the antiallergic reactions of the *Herba Houttuyniae* extract. *Kor J Herbology*. 1998;13:77-89.
12. Chun EY. Partial purification of *Houttuynia cordata* Thunb extract and characterization of its immunological activities in human. *MS Thesis*. Seoul National University, 1997.
13. 김진, 류혜숙, 신정희, 김현숙. 魚腥草 추출물 첨가가 마우스 면역능 증진에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*. 2005;34(2):167-175.
14. 차재영, 전병삼, 박정원, 문재철, 조영수. 차가버섯과 魚腥草 함유 발효 조성물이 인체 위함 AGS 및 대장암 HCT-15 세포 생육에 미치는 영향. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2004;47(2):202-7.
15. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod*. 2007;22(11):2928-2935.
16. Lee KS, Chung JH, Lee KH, Shin MJ, Oh BH, Hong CH. Bioplex analysis of plasma cytokines in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Immunol Lett*. 2008;121(2):105-9.
17. 김호철. *한약약리학*. 서울:집문당. 2001:165-6.
18. Moncada S, Higgs A, the L-arginine nitric oxide pathway. *N ENGL J MED*. 1993;329:2002-2012.
19. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS*. 1992;17:399-402.
20. Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News*. 1993:26-38.
21. Abul KA, Andrew HL. *Cellular and Molecular Immunology*, Saunders, 2003;243-2 74
22. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1175-1183.
23. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, Boulet L, Hamid Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- $\beta$ , IL-11, IL-17 and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:1293-8.
24. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- $\beta$  and TNF- $\alpha$  by human macrophages. *J Immunol*. 1998;160(7):3513-3521.
25. Andoh A, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno T, Bamba T, Fujiyama Y. IL-17 selectively down-regulates TNF- $\alpha$ -induced RANTES gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J Immunol*. 2002;169:1683-7.
26. Agostini C, Cassatella M, Zambello R, Trentin L, Gasoerini S, Perin A et al. Involvement of IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J Immunol*. 1998;161:6413-6420.
27. Agostini C, Facco M, Siviero M, Carollo D, Galvan S, Cattelan AM et al. CXC chemokines IP-10 and mig expression and direct migration of pulmonary CD8+/CXCR3+ T cells in the lungs of patients with HIV infection and T-cell alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1466-1473.
28. Nakayama S, Mukae H, Ishii H, Kakugawa T, Sugiyama K, Sakamoto N et al. Comparison of BALF concentrations of ENA-78 and IP10 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia. *Respir Med*. 2005;99:1145-51.
29. Pignatti P, Brunetti G, Moretto D, Yacoub MR, Fiori M, Balbi B et al. Role of the chemokine receptors CXCR3 and CCR4 in human pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:310-7.
30. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PS, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ and Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophils chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*. 1994;791-881
31. Paul DP, Shixin Q, Douglas JR, Ian CL, Juan W, Nasim K, Heidi S, Xiaojie S, Jose-Angel G, Walter N, Jose C, Gutierrez R and Charles RM. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, Eotaxin. *J Clin Invest*. 1996;97:604
32. Garcia-Zepeda EA, Rothenbeng ME, Ownbey RT, Celestin J, Lender P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med*. 1996;2:449-456.