

# 黃芩 발효 추출물이 LPS로 유발된 마우스대식세포에서 염증인자증가에 미치는 영향

양희정<sup>1#</sup>, 한효상<sup>2</sup>, 이영종<sup>1\*</sup>

1 : 가천대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 중부대학교 보건행정학과

## Effect of Fermented *Scutellariae Radix* Extract on Production of Inflammatory Mediator in LPS-stimulated Mouse Macrophages

Hoi-Jeong Yang<sup>1#</sup>, Hyo-Sang Han<sup>2</sup>, Young-Jong Lee<sup>1\*</sup>

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

2 : Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University Geumsan 312-702, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : This study aims at examining the immuno-modulating activity in the fermentative extract of the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi (*Scutellariae Radix*) on the production of inflammatory mediator in LPS-stimulated RAW264.7 mouse macrophages.

**Method** : Measurements were done for the influences on the cell viability, generation of hydrogen peroxide in cells and nitric oxide (NO) generation using the macrophage of mouse with the specimen SBS as the fermentative extract of *Scutellariae Radix* (SBS) with *Saccharomyces cerevisiae* STV89.

**Result** : As a result of carrying out MTT assay to check the cellular toxicity of the fermentative extract of *Scutellariae Radix*, any excessive toxicity to the macrophage did not occur from treatments by concentration for SBS. SBS increased the generation of hydrogen peroxide in the macrophage. SBS suppressed the NO generated in macrophages and SBS concentration higher than 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  significantly suppressed the increased NO generated in LPS-stimulated macrophages. SBS concentration higher than 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  significantly suppressed the generation of IL-6, IL-10, IL-12p40 and MCP-1 in LPS-stimulated macrophages.

**Conclusion** : Our findings indicate that SBS has an immuno-modulating activity in macrophage activation through suppressing the generation of inflammatory substances, NO, IL-6, IL-10, IL-12p40 and MCP-1.

**Key words** : *Scutellariae Radix*, fermentation, cellular toxicity, immuno-modulating activity, cytokine

## 서론

발효한약은 전통발효공법을 통해 한약재를 미생물이 잘 이용할 수 있게 찌거나 삶은 다음, 공기 중의 미생물 또는 유산균과 같은 순수 분리 미생물을 이용하여 발효한 한약재를 말한다. 이는 한약재 약효성분의 체내흡수율과 생체 이용률을 모두 극대화시킨 일종의 가공방법으로 약리적 기능성 뿐만 아니라 한약의 제형개량과 포제방법을 향상시킬 수 있고 이를 통해 한약의 새로운 수요를 창출하고 고부가치의 새로운 한약

제품을 개발할 수 있다는데 그 의의를 두고 있다<sup>1)</sup>.

발효 한약에 대한 선행 연구 논문으로 윤 등<sup>2)</sup>은 유산균으로 발효된 한국산 겨우살이 추출물의 면역학적 활성화와 중앙전이 억제효과를 보고하였고, 손<sup>3)</sup>은 버섯균사체로 발효시킨 복령과 후박의 항산화 및 항암효과를 보고하였고, 정 등<sup>1)</sup>은 인진호, 금은화, 지구자 등의 한약재를 주원료로 제조된 발효추출물로 숙취해소 효능을 보고하였고, 차 등<sup>4)</sup>은 차가버섯과 어성초 함유 발효 조성물로 암 예방 및 항암식·의약품의 소재 개발 가능성을 제시하였다. 이러한 최근의 발효연구동향에

\*교신저자 : 이영종, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, 가천대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 031-750-5415 · E-mail : garak@gachon.ac.kr  
#제1저자 : 양희정, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, 가천대학교 한의과대학 본초학교실  
· HP : 010-8394-3070 · E-mail : gana8700@yahoo.co.kr  
· 접수 : 2013년 8월 15일 · 수정 : 2013년 9월 15일 · 채택 : 2013년 9월 17일

주목하여 淸熱瀉火, 燥濕解毒, 止血, 安胎의 효능이 있는 黃芩을 약재로 선택하여 黃芩 발효 추출물의 면역활성에 대한 연구를 하게 되었다.

黃芩은 神農本草經<sup>5)</sup> 中品에 “黃芩, 味苦平. 主諸熱黃疸, 腸澼, 泄利, 逐水, 下血閉, 惡創恒蝕, 火瘍, 一名腐腸, 生川谷.” 이라고 처음 收載되었으며, 임상에서 淸熱瀉火, 燥濕解毒, 止血, 安胎의 효능으로 肺熱咳嗽, 熱病高熱神昏, 肝火頭痛, 目赤腫痛, 濕熱黃疸, 瀉痢, 熱淋, 吐衄, 崩漏, 胎熱不安, 癰腫疔瘡 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다<sup>6)</sup>.

黃芩의 성분으로는 flavonoid계 화합물로서 30여 종이 분리되어 있는데, baicalein, biacalin, chrysin, oroxylin-A, oroxylin- $\alpha$ -7-O-glucuronide, wogomin, wogonoside, skullcapflavone, dihydrobaicalin 등이 있다<sup>7)</sup>. 黃芩의 약리 작용으로는 항천식작용<sup>8)</sup>, 항암작용<sup>9)</sup>, 항균작용<sup>10)</sup>, 항산화활성<sup>11)</sup>, 항고지혈효과<sup>12)</sup>, 생체보호작용<sup>13)</sup>, 면역조절기능<sup>14)</sup> 등이 보고 되었다.

이에 저자는 본 연구에서 黃芩을 *Saccharomyces cerevisiae* STV89(효모)로 발효 추출하여 제조하여(SBS) lipopolysaccharide(LPS)에 의해 활성화된 마우스 대식세포에서 세포생존율, 세포내 하이드로젠 퍼록사이드( $H_2O_2$ )생성, 일산화질소(nitric oxide; NO) 생성 및 각 종 사이토카인(IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1) 생성에 미치는 영향을 조사하여 염증물질 억제효과에 대한 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 黃芩(*Scutellariae Radix*)은 대한민국 서울의 경동시장에서 2007년 10월에 구입하였으며, 약재는 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고 모든 약재는 실험 전에 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다. 黃芩의 발효에 사용한 균주로는 *Saccharomyces cerevisiae* STV89(효모)를 사용하였다.

#### 2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 마우스 복강 대식세포(mouse macrophage line)인 Raw 264.7 세포로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 ethyl alcohol (Samchun Chemical, Korea), DMSO (Sigma, USA), DMEM (Sigma, USA), 1×PBS (Sigma, USA), EDTA (Sigma, USA), isopropanol (Sigma, USA), trypsin-EDTA (Sigma, USA), Bio-Plex cytokine assay kit (Panomics, USA) 등이 사용 되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> incubator (Nuair, USA), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), research microscope (Becton dickinson, USA), centrifuge (Hanil, Korea), fume hood (Hanil, Korea), clean bench (Jeio

thec, Korea), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader (Bio-Rad, USA), vortex mixer (Vision Scientific Co, Korea), water bath (Intron Biotech, Korea), ice-maker (Vision Scientific Co, Korea) 등이다.

## 2. 방법

### 1) 시료의 제조

黃芩 50 g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 환류추출기에 1차 증류수 2,000 mL와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper (Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 17.4 g을 얻었으며, 수율은 34.8 %였다.

위에서 제조된 黃芩 추출물을 이용하여 다음과 같은 방법으로 黃芩 발효 추출물을 제조하였다.

- ① 조효소 조제 : 조효소제인  $\alpha$ -Herbzyme (한국효소) 3 g에 증류수 100 mL를 가하고 37°C에서 30분간 침출하여 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.
- ② 열수추출하여 건조한 黃芩추출물(3.0 g, pH:4.72)을 Screw cap tube에 담고 미리 추출된 조효소액 2.2 mL를 첨가하여 37°C에서 2시간 효소반응하였다.
- ③ 효소반응 후 95°C에서 10분간 살균하였다.
- ④ *Saccharomyces cerevisiae* STV89를 黃芩추출물에 4 %씩 접종하여 30°C에서 4일간 배양하였다.
- ⑤ 배양 후 60°C에서 20분간 열처리하였다.
- ⑥ *Saccharomyces cerevisiae* STV89에서 배양 후 pH는 4.75였다.

### 3) 세포 배양

Raw 264.7 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100  $\mu$ g/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Raw 264.7 세포를 75 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어준 후 50 mL flask 당 1 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 배양용기(50 mL culture flask)에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

### 4) 세포독성 검사(cytotoxicity assay)

준비된 시료가 Raw 264.7 세포에 나타내는 세포독성 유발 정도를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well의 세포를 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS)

용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 100 $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 처리하여 알루미늄 호일로 차광시킨 후 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 $\mu\text{l}$  처리하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability}(\%) = 100 \times \text{AT} / \text{AC}$$

AC : absorbance of control  
AT : absorbance of tested extract solution.

5) 과산화수소(Hydrogen peroxide) 생성 측정

세포내의 과산화수소(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )의 생성량은 dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 이용하여 측정하였다. 먼저, 96 well plate  $1 \times 10^4$  cells/well의 cell을 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  Incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1 $\times$ PBS) 용액으로 씻어주었다. 다양한 농도의 시료(0, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간동안 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  Incubator에서 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포내  $\text{H}_2\text{O}_2$  생성은 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{Intracellular Productions of } \text{H}_2\text{O}_2(\%) = 100 \times \text{AT} / \text{AC}$$

AC : absorbance of control  
AT : absorbance of tested extract solution.

6) 일산화질소(Nitric oxide) 생성 측정

일산화질소(nitric oxide, NO)의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(griess reagent : 0.5 % sulfanilamide, 2.5 % phaphate, 0.5 % naphthylethylenediamine dihydrochloride, NED)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 추정하기 위해 Microplate Reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생성정도를 비교하였다. 이를 위해 다음과 같이 실험하였다. LPS를 단독처리 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  Incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100  $\mu\text{l}$ 을 채취하여 여기에 그리스 시약 100  $\mu\text{l}$ 을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 Microplate Reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 nitric oxide 생성은 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{Productions of Nitric oxide}(\%) = 100 \times \text{AT} / \text{AC}$$

AC : absorbance of control  
AT : absorbance of tested extract solution.

7) 사이토카인(cytokine) 분비 측정

사이토카인 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Anderson 등<sup>15)</sup>의 방법을 응용하여 Bio-Plex Cytokine Assay를 다음과 같이 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 $\times$ PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS를 단독처리(2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )하거나 혹은 다양한 농도의 시료(25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액을 채취하여 Bio-Plex Suspension Array System의 Bio-Plex Cytokine Assay를 실시하여 각종의 싸이토카인류(IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1)의 발현에 대한 시료의 영향을 계산, 비교하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 mean  $\pm$  SEM로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 ANOVA test와 Student's t-test로 분석하여 p-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. SBS가 대식 세포에 미치는 영향

1) 세포독성에 대한 효과

SBS가 대식 세포의 증식에 미치는 영향을 비교하였다. 24시간 배양처리 한 결과 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 모든 농도에서 세포생존률이 증가하였다(Fig. 1).

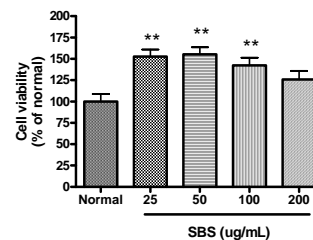


Fig. 1. Effect of SBS on cell viability in Raw 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. SBS : Water extract of *Scutellariae Radix* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89. Normal : Treated with media only. \*\* represents  $P < 0.01$  compared to the normal.

2) 과산화수소 생성에 대한 효과

SBS가 대식세포의 과산화수소(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과, 24시간 배양에서 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 모든 농도에서 모두 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 2).

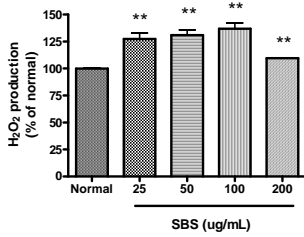


Fig. 2. Effect of SBS on the intracellular production of hydrogen peroxide in Raw 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. SBS : Water extract of *Scutellariae Radix* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89. Normal :Treated with media only. \*\* represents  $P < 0.01$  compared to the normal.

### 3) 산화질소의 생성에 대한 효과

#### (1) 대식세포에서의 효과

SBS가 정상 대식세포의 산화질소(NO) 생성에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과, 24시간 배양에서 25  $\mu\text{g/mL}$  이상의 모든 농도에서 모두 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3).

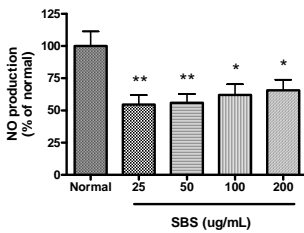


Fig. 3. Effect of SBS on the nitric oxide production in Raw 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. SBS : Water extract of *Scutellariae Radix* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89. Normal :Treated with media only. \* represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \*\* represents  $P < 0.01$  compared to the normal.

#### (2) LPS로 활성화된 대식세포에서의 효과

SBS가 LPS로 활성화된 대식세포로부터 NO의 생성 증가에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과, 24시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 정상군(Normal) 보다 NO 생성이 유의하게 증가하였으며 LPS로 활성화된 대식세포에 SBS를 처리한 경우 SBS는 25  $\mu\text{g/mL}$  이상의 모든 농도에서 모두 유의하게 감소되었다(Fig. 4).

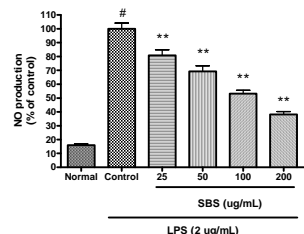


Fig. 4. Effect of SBS on the nitric oxide production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS; 2  $\mu\text{g/mL}$ ). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. SBS : Water extract of *Scutellariae Radix* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.

Normal : Treated with media only.  
Control : Treated with LPS only.

# represents  $P < 0.01$  compared to the normal.  
\*\* represents  $P < 0.01$  compared to the control.

### 4) 면역사이토카인 생성에 대한 효과

#### (1) IL-6 생성에 대한 효과

SBS가 LPS로 활성화된 대식세포에서 IL-6 생성 증가에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과, 24시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 정상군(Normal)보다 유의하게 IL-6 생성이 증가하였으며, LPS로 활성화된 대식세포에 SBS를 처리한 경우 25  $\mu\text{g/mL}$  이상의 모든 농도에서 모두 유의하게 감소되었다(Fig. 5).

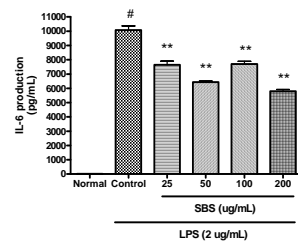


Fig. 5. Effect of SBS on the IL-6 production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (2  $\mu\text{g/mL}$ ). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. SBS : Water extract of *Scutellariae Radix* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89. Normal : Treated with media only. Control : Treated with LPS only. # represents  $P < 0.01$  compared to the normal. \*\* represents  $P < 0.01$  compared to the control.

#### (2) IL-10 생성에 대한 효과

SBS가 LPS로 활성화된 대식세포에서 IL-10 생성 증가에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과, 24시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 정상군(Normal)보다 유의하게 IL-10 생성이 증가하였으며, LPS로 활성화된 대식세포에 SBS를 처리한 경우 25  $\mu\text{g/mL}$  이상의 모든 농도에서 모두 유의하게 감소되었다(Fig. 6).

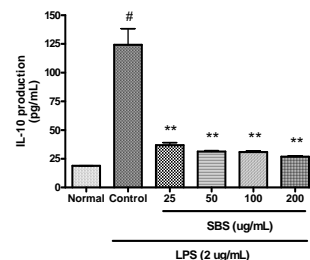


Fig. 6. Effect of SBS on the IL-10 production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (2  $\mu\text{g/mL}$ ). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. SBS : Water extract of *Scutellariae Radix* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89. Normal : Treated with media only. Control : Treated with LPS only. # represents  $P < 0.01$  compared to the normal. \*\* represents  $P < 0.01$  compared to the control.

#### (3) IL-12p40 생성에 대한 효과

SBS가 LPS로 활성화된 대식세포에서 IL-12p40 생성 증

가에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과, 24시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 정상군(Normal)보다 유의하게 IL-12p40 생성이 증가하였으며, LPS로 활성화된 대식세포에 SBS를 처리한 경우 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 모두 유의하게 감소되었다(Fig. 7).

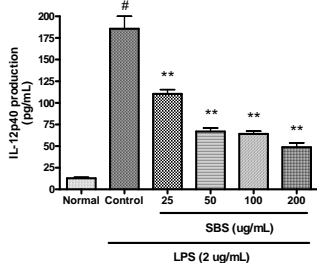


Fig. 7. Effect of SBS on the IL-12p40 production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (2 µg/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean ± SEM of three independent experiments. SBS : Water extract of *Scutellariae Radix* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89. Normal : Treated with media only. Control : Treated with LPS only. # represents  $P < 0.01$  compared to the normal. \*\* represents  $P < 0.01$  compared to the control.

(4) MCP-1 생성에 대한 효과

SBS가 LPS로 활성화된 대식세포에서 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 생성 증가에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과, 24시간동안 LPS 단독으로 배양한 경우 정상군(Normal)보다 유의하게 MCP-1 생성이 증가하였으며, LPS로 활성화된 대식세포에 SBS를 처리한 경우 25 µg/mL 이상의 모든 농도에서 모두 유의하게 감소되었다 (Fig. 8).

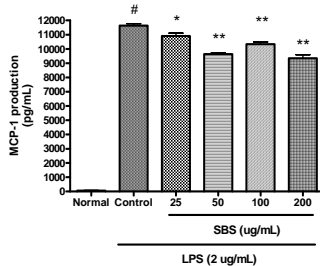


Fig. 8. Effect of SBS on MCP-1 production in Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (2 µg/mL). Cells were incubated for 24 hrs. Values are the mean ± SEM of three independent experiments. SBS : Water extract of *Scutellariae Radix* Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89. Normal : Treated with media only. Control : Treated with LPS only. # represents  $P < 0.01$  compared to the normal. \* represents  $P < 0.05$  compared to the normal. \*\* represents  $P < 0.01$  compared to the control.

고찰

黃芩은 名醫別錄<sup>16)</sup>에 “治痰熱, 胃中熱, 小腹絞痛, 消谷, 利小腸, 女子血閉, 淋露, 下血, 小兒腹痛.” 이라고 수록 된 이래 味苦 性寒<sup>17)</sup>하고, 淸熱瀉火, 燥濕解毒, 止血, 安胎의 효능으로 肺熱咳嗽, 熱病高熱神昏, 肝火頭痛, 目赤腫痛, 濕熱黃疸,

瀉痢, 熱淋, 吐衄, 崩漏, 胎熱不安, 癰腫疔瘡 등을 치료하는 약물로 사용되고 있다<sup>6)</sup>.

이 약은 뿌리로 원주상 ~ 반관상 또는 평판상을 이루고 길이 5 ~ 25 cm, 지름 5 ~ 30 mm이다. 바깥면은 황갈색을 띠고 조잡하고 뚜렷한 세로 주름이 있으며 균테균테 결뿌리자국 및 갈색의 주피 파편이 남아 있다. 위쪽 끝에는 줄기자국 또는 줄기의 그루터기가 붙어 있다. 목은 뿌리에서는 목부가 썩어서 흑갈색으로 되고 때로 속이 비어 있다. 질은 단단하고 부서지기 쉽다. 꺾인 면은 황색이고 섬유성이다<sup>18)</sup>.

黃芩의 성분으로는 flavonoid계 화합물로서 30여 종이 분리되어 있는데, baicalein, biacalin, chrysin, oroxylin-A, oroxylin- $\alpha$ -7-O-glucuronide, wogomin, wogonoside, skullcapflavone, dihydrobaicalin 등이 있다<sup>7)</sup>.

약리에 대한 연구로는 황 등<sup>8)</sup>은 항천식작용, 서 등<sup>9)</sup>은 항암작용, 이 등<sup>10)</sup>은 항균작용, 김 등<sup>11)</sup>은 항산화활성, 노 등<sup>12)</sup>은 항고지혈효과, 박 등<sup>13)</sup>은 생체보호작용, 이 등<sup>14)</sup>은 면역조절기능을 보고하였다.

발효(fermentation)는 넓은 의미에서 미생물을 이용하여 그 효소작용으로 유기물을 전환시키는 것을 뜻한다. 발효현상은 유사 이래 인류에 의해서 관찰되고 이용되어 왔으나, 명확하게 발효현상을 인식하게 된 시기는 확실하지 않다. 지구상에 생명체의 탄생과 더불어 발생하여 인류의 역사만큼 오랫동안 이용되어 온 발효현상도 그 본체가 밝혀지기 시작한 것은 200년이 되지 않는다. 발효란 뜻의 fermentation은 라틴어의 fervervel(끓는다)로부터 유래되었으며, 이것은 알콜발효시에 발생하는 탄산가스에 의해서 거품이 일게 되는 현상을 나타낸 것으로 추측된다<sup>19)</sup>.

최근 한의학계에서도 발효한약이라는 제제를 도입하여 임상에서 사용하고 있으나 아직 탕약이 주된 제형으로 사용되는 추세에서 발효 한약은 다소 생소한 이름이다. 하지만 환자를 치료하는데 좀 더 나은 방법이 있다면 새로운 제제로의 접근도 의미 있을 것으로 생각된다<sup>20)</sup>.

이에 著者は 발효한약의 유의성을 적용하여 黃芩을 발효 추출하여 만들어진 시료 SBS로 마우스 대식세포를 이용한 세포 생존도, 세포내 과산화수소 및 산화질소 생성, 그리고 사이토카인(IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1) 생성에 미치는 영향을 측정하였다.

*Saccharomyces*속의 대표균종인 *Saccharomyces cerevisiae*는 영국의 맥주공장에서 분리된 맥주효모로 맥주 자발효가 지나면 액표면에 거품과 함께 떠오르는 상면발효효모(上面醱酵酵母, top fermentation yeast)이다. 맥주, 포도주 등의 각종 주류, 알코올, 빵 등의 제조에 이용되는 등 이용범위가 넓은 효모로 glucose, galactose, maltose, sucrose 및 일부 raffinose를 발효하고 lactose는 발효하지 못한다.<sup>21)</sup> 발효미생물 *Saccharomyces*계통은 생화학적 성질이 일정하고, 물에 잘 분산되며, 자기소화에 대한 내성이 있어서 보존성이 좋고, 당밀배지에서 증식속도가 빠르고 수득률이 높은 성질이 있다<sup>22)</sup>. 이에 본 실험에서는 *Saccharomyces cerevisiae* STV89 (효모)를 균주로 이용하여 발효하였다.

본 연구에서는 마우스 대식세포인 Raw 264.7 세포에 발효 黃芩 추출물을 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 처리하여 세포생존율에 대한 효과를 측정한 결과, 25 µg/mL 이상의 농도에서 정상세포에 비하여 黃芩 발효 추출물이 유의한

세포생존을 감소를 나타내지 않았으며 이는 발효 黃芩 추출물이 세포독성을 유발하지 않는다는 것으로 볼 수 있다.

과산화수소(Hydroperoxide,  $H_2O_2$ )는 대부분의 세포 내에서 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 일종으로 일반적으로 세포의 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하는 인자이며 인체의 면역기능에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, 인체 내의 염증반응이 시작되면 대식세포나 호중구(neutrophils) 등의 면역세포는 과산화수소 생성이 증가하고 이는 면역학적 반응(immunologic reaction)을 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근의 연구에서는 대식세포의 과산화수소 생성 증가가 인체에 침입한 병원체를 공격하는 작용뿐만 아니라, T 세포와 관련된 관절염(arthritis)을 억제하는 등 자가면역질환 발생을 방어하는 작용도 있음이 보고된 바 있다<sup>23,24</sup>. 본 연구에서 SBS가 대식세포의 과산화수소 생성에 미치는 영향을 비교한 결과, SBS의 모든 처리 농도에서 유의한 증가를 나타내었다. 이는 SBS에 의한 대식세포의 과산화수소 생성 증가는 SBS가 병원체 제거뿐 아니라 면역 질환 발생을 억제 하는 치료제로서 개발 가능성을 의미하는 것이다.

산화 질소(nitric oxide, NO)는 사이토카인의 자극 또는 미생물의 침입으로 인해 세포가 활성화됨으로써 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NOS에는 세포 특이적으로 발현되는 neuronal NOS, endothelial NOS의 사이토카인에 의해 유도되는 inducible NOS(iNOS)가 있다. 특히 iNOS에 의해 생성되는 NO는 면역 염증반응에 관련이 있으며, 혈관 내에서는 동맥경화와 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>25,26</sup> 본 연구에서 SBS는 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 모든 농도에서 대식세포로부터 NO의 생성을 감소시켰으며, 또한 LPS로 활성화된 대식세포에서의 NO 생성 증가를 유의하게 억제시키는 것으로 나타났다. 이는 SBS가 활성화된 대식세포로부터 분비되는 NO의 증가를 효과적으로 억제함으로써 NO 증가로 악화될 수 있는 급성 혹은 만성 염증반응을 제어할 수 있는 효능을 가지고 있음을 의미한다.

사이토카인 중에 특히 인터루킨류(interleukins)는 림프구, 대식세포를 포함한 백혈구 간 상호 신호전달역할을 하는 면역 조절 단백질군에 속하며 현재까지 약 100 여종이 밝혀져 있고, 소량으로도 대식세포의 탐식작용을 도와주는 등 각종의 면역반응을 조절하는 것으로 알려져 있는 중요한 염증매개인자이다. 또한 IL-6는 림프계세포와 골수성 림프계세포에서 생성되며 감염이나 손상 등에 의한 급성반응을 보이며 면역에 관여하는 세포의 성장과 분화에 관여한다.<sup>27</sup> IL-10은 중요한 면역 조절 사이토카인으로 면역 억제, 항염증반응 및 B 림프구 자극 특성을 포함하는 광범위한 생화학적 작용 범위를 갖고 있다<sup>28</sup>. 본 연구에서 SBS는 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 모든 농도에서 LPS로 활성화된 대식세포로부터 IL-6과 IL-10의 생성 증가를 유의하게 감소시켰다. IL-12는 수지상세포(dendritic cell), 대식세포, 인간 B 세포 등에서 분비되며 안정기의 T 세포와 B 세포를 활성화시키며, T 세포에 의한 interferon gamma 분비 증가, NK 세포의 활동 증가, stem cell의 조혈과정을 촉진하는 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>29</sup> 본 연구에서 SBS는 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 모든 농도에서 LPS로 활성화된 대식세포에서 IL-12p40 생성 증가를 유의하게 감소시켰다. Monocyte chemoattractant protein-1

(MCP-1)은 LPS에 의해 활성화된 대식세포, 단핵구(monocyte), 비만세포(mast cell), 중성구(neutrophil), 성상세포(astrocyte), 섬유아세포(fibroblast) 등의 많은 면역세포에서 분비되는 사이토카인으로 세포성 면역반응 조절 및 세포 성장과 분화에 관련되어 있다. 또한 MCP-1은 면역체계에서 세균의 감염 시 염증반응을 매개하여 이를 제거하는 역할을 하며 혈관내피세포(vascular endothelial cell)을 자극하여 주위의 세포들을 자연사멸(apoptosis)시키는 역할을 하기도 한다<sup>30,31</sup>. 본 연구에서 SBS는 LPS로 활성화된 대식세포에서의 MCP-1 생성 증가를 유의하게 감소시켰다.

이러한 활성화된 대식세포에서의 다양한 사이토카인 생성 증가에 대한 黃芩의 억제작용은 이미 윤 등<sup>32</sup>에 의하여 보고된 바 있다. 그러나 본 연구를 통해 발효 황금(SBS)의 염증 억제작용에 대한 효과는 확인한 결과 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서의 IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1의 생성 증가가 억제됨을 확인하였으며, 이는 SBS가 면역조절 사이토카인의 발현을 조절함으로써 염증 반응 조절 효능이 있음을 의미하는 것이다.

이상의 결과, 黃芩 발효 추출물은 대식세포에 세포독성을 유발하지 않는 농도에서 과산화수소의 생성을 증가시키고 산화질소의 생성을 감소시켰으며 LPS로 활성화된 대식세포에서 IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1 등의 면역사이토카인 생성 증가를 억제시킴으로써 유의한 면역조절 활성이 있음을 알 수 있었다. 앞으로 黃芩 발효 추출물을 이용한 대식세포 연관 면역질환 치료제로의 개발을 위하여 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

*Saccharomyces cerevisiae* STV89 효모로 발효 추출한 黃芩의 마우스 대식세포인 RAW274.7 세포에서의 염증유발 물질 생성에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黃芩 발효 추출물은 대식세포의 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 黃芩 발효 추출물은 정상 대식세포에서 세포내 과산화수소(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ) 생성을 유의하게 증가시켰다.
3. 黃芩 발효 추출물은 정상 대식세포의 NO의 생성을 억제시켰으며, LPS로 활성화된 대식세포의 NO 생성 증가를 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 모두 유의하게 감소시켰다.
4. 黃芩 발효 추출물은 LPS로 활성화된 대식세포에서 IL-6, IL-10, IL-12p40, MCP-1 생성을 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 모두 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과, 黃芩 발효 추출물은 대식세포에 세포독성을 유발하지 않는 농도에서 과산화수소 생성 증가 및 활성화된 대식세포로부터 산화질소의 생성과 면역조절 사이토카인의 생성을 억제함으로써 유의한 면역활성을 가지는 나타났다.

## References

- Jung YJ, Han DO, Choi BH, Park C, Lee HJ, Kim SH, Hahm DH. Effect of Fermented Herbal Extracts, HP-1 on Enzyme Activities and Gene Expressions Related to Alcohol Metabolism in Ethanol-loaded Rats. *Korean J Orient Physiol Pathol*, 2007 ; 21(2) : 387-91.
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Lee KH, Kwak JH, Baek YJ, Huh CS, Kim JB. Fermented Extracts of Korean Mistletoe with *Lactobacillus* (FKM-110) Stimulate Macrophage and Inhibit Tumor Metastasis. *Korean J Food Sci Technol*, 1999 ; 31(3) : 838-47.
- Shon MY. Antioxidant and Anticancer Activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* Fermented with Mycelial Mushrooms. *Food Ind Nutr*, 2007 ; 12(2) : 51-7.
- Cha JY, Jeon BS, Park JW, Moon JC, Cho YS. Effect of Fermented Compositions Containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* on Growth of Human AGS Gastric and HCT-15 Colon Cancer Cells. *J Kor Soc Appl Biol Chem*, 2004 ; 47(2) : 202-7.
- Wu B. *Shennongbencaojing*. Beijing : Kexuejishuwenxian publisher, 1999 : 64.
- State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. *Zhonghuabencao*. Vol. 7. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : 200-10.
- Kim HC. *Hanyakyakri-Hak*. Seoul : Jipmoondang, 2001 : 129-33.
- Hwang DY, Lee SC, Shin DH, Shin MK, Kim JH, Jeong JG, Song HJ. Original Articles : The effect of Radix *Scutellariae* Water Extract on the asthma induced by Ovalbumin. *Kor J Herbology*, 2004 ; 19(4) : 117-25.
- Seo WG, Jeong JC. Effects of *Trichosanthes kirilowii* Maxim and *Scutellaria baicalensis* Georgi on IL-1 $\beta$ -induced GnT-III and V in Melanoma B-16. *J Kor Orient Oncol*, 1999 ; 5(1) : 103-18.
- Lee CK, Seo JJ. Antimicrobial Activity of Whangkumtang Extract and *Scutellariae Radix* Extract on the Food-Borne Pathogens. *J Kor Soc Food Sci Nutr*, 2005 ; 34(10) : 1606-10.
- Kim YH, Park YS. Effect of *Scutellaria baicalensis* Water Extract on Antioxidative Activity and Epidermal Thickness in DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis Animal Model. *J Kor Soc Food Sci Nutr*, 2006 ; 35(5) : 543-8.
- Ro HS, Ko WK, Kim OJ, Park KK, Cho YW, Park HS. Antihyperlipidemic Activity of *Scutellaria baicalensis* Georg., *Coptidis japonica* Makino and *Rhei koreanum* Nakai on Experimental Hyperlipidemia in Rats. *J Pharm Invest*, 1996 ; 26(3) : 36-48.
- Park SN, Hong JH, Park MK. Biological Protective Effect of Component from *Scutellaria baicalensis* Georgi against Active Oxygen Induced-Tissue Damage. *Seoul National University of Science and Technology Research Bulletin*, 1997 ; 45 : 35-49.
- Lee SH, Lim BO, Choue RW. Immunoregulatory Effects of Water Extracts of *Scutellariae Radix* in DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease Animal Model. *Korean J Nutr*, 2004 ; 37(6) : 431-9.
- 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) : 2928-35.
- Tao HJ. *Mingyibielu*. Beijing : Renminweisheng publisher, 1986 : 115-6.
- Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY. *Boncho-Hak*. Seoul : Young-Lim Press, 2004 : 227-8.
- Korea Food and Drug Administration. *The Korean Pharmacopoeia Tenth Edition*. Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2012 : 128-130.
- Sim SK, Son HS, Sim CH, Yoon WH, Hwang JH, Bang BH. *Balhyosikpum-Hak*. Seoul : Jinro publisher, 2001 : 11.
- Cho SI, Kim HW, Lee GJ. Biological Activities of Extracts of Fermented *Camellia japonica* Leaf and Flower. *Kor J Herbology*, 2006 ; 21(2) : 55-62.
- Kang CK, Kim YJ, Park SK, Cho GY, Cho DB, Cho SG, Chae GS. *Sikpummissaengmul-Hak*. Paju : Jigumoonhwasa, 2003 : 73.
- Ha DM. *Sinpyeon Balhyogong-Hak*. Seoul : Moonundang, 1994 : 288.
- Gelderman KA, Hultqvist M, Pizzolla A, Zhao M, Nandakumar KS, Mattsson R, Holmdahl R. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J Clin Invest*, 2007 ; 117(10) : 3020-8.
- Hultqvist M, Bäcklund J, Bauer K, Gelderman KA, Holmdahl R. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunol*, 2007 ; 179(3) : 1431-7.
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2001 ; 2(10) : 907-16.
- Du C, Guan Q, Diao H, Yin Z, Jevnikar AM. Nitric oxide induces apoptosis in renal tubular epithelial cells through activation of caspase-8. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006 ; 290(5) : 1044-54.
- Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and

- its receptor a paradigm for cytokines. *Science*. 1992 ; 258(5082) : 593-7.
28. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993 ; 11 : 165-90.
29. Kaliński P, Hilkens CM, Sniijders A, Sniijedewint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E<sub>2</sub>, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol*. 1997 ; 159(1) : 28-35.
30. Conti P, Boucher W, Letourneau R, Feliciani C, Reale M, Barbacane RC, Vlagopoulos P, Bruneau G, Thibault J, Theoharides TC. Monocyte chemoattractant protein-1 provokes mast cell aggregation and [<sup>3</sup>H]5HT release. *Immunology*. 1995 ; 86(3) : 434-40.
31. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA. Monocyte chemoattractant protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med*. 1992 ; 175(5) : 1271-5.
32. Yoon SB, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae H, Kim HM, Ko SG, Choi HY, Oh MS, Park W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2009 ; 125(2) : 286-90.