

발효 艾葉 추출물이 인간 간암세포주 HepG2 활성화에 미치는 영향

한효상*

중부대학교 보건행정학과

Effect of Fermented Artemisiae Argyi Folium on Human Hepatoma Cell Line HepG2 Activity

Hyo-Sang Han*

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

ABSTRACT

Objective : The purpose of this study was to investigate the effect of fermented Artemisiae Argyi Folium(AAF) on some activities of human hepatoma cell, HepG2.

Method : To investigate the effect of fermented Artemisiae Argyi Folium(AAF) activity on the human hepatoma cells, AAF extracts was fermented by *Lactobacillus pentosus* K34(AFL) and *Sacchromyces cerevisiae* STV89(AFS). And the effects of AFL or AFS on the activities of HepG2 cell, such as cell viability, nitric oxide(NO) production and reactive oxygen species(ROS) production, were tested.

Result : Human Hepatoma Cells were incubated each for 3 hours and 24 hours. Human Hepatoma Cells treated with the extract was measured with MTT assay. Then AFL was found to be non-toxic at concentrations of 10 ug/mL(3h), 100 ug/mL(24h) or more. AFS was the same result at concentrations of more than 10 ug/mL. The extract increased ROS generation in Human Hepatoma Cells. AFL increased at concentrations of 100 ug/mL more (3h, also 10 ug/mL more) and 50 ug/mL(24h) and AFS increased both 50 ug/mL. In point of NO generation, AFL inhibited at concentrations of 10 ug/mL(3h) and 100 ug/mL(24h) more (3h, also 10 ug/mL more) and AFS also inhibited 50 ug/mL or more.

Conclusion : AFL and AFS, obtained from Artemisiae Argyi Folium extracts by fermentation, reduced the NO production and increased ROS production in HepG2 cell, without cytotoxicity on HepG2 cell. The results suggested that AFL and AFS increased the immunological effects of Artemisiae Argyi Folium extracts.

Key words : Artemisiae Argyi Folium, fermentation, cell viability, nitric oxide, reactive oxygen species

서론

최근 발효한약이 상당한 관심을 모으고 있는데, 그 이유는 일부 또는 다수 한약의 유효성분은 대부분 당이 붙은 고분자로 구성되어있는 경우가 많아 그럴 경우에는 체내 흡수에 장애가 있으나, 발효를 하면 당이 떨어져 나가면서 저분자화 되어 체내흡수율이 증가되기 때문이다¹⁾. 따라서 발효한약은 한약재 약효성분의 체내흡수율과 생체 이용률을 모두 극대화시키는 경우가 있고²⁾, 원래의 성질이 변하여 새로운 치료 작용을 나타내는 약물이 얻어지는 경우도 있다³⁾.

艾葉은 국화과(菊科 : Compositae)에 속한 多年生 草本

인 황해속 *Artemisia argyi* Lev. et Vant., 속 *Artemisia princeps* Pamp. var. *orientalis* Hara 또는 산쭉 *Artemisia montana* Pampani의 잎 및 어린줄기로4), 여름에 꽃이 피기 전에 따서 曬乾한다⁵⁾.

艾葉은 名醫別錄⁶⁾에 “艾葉, 生田野. 三月三日采, 暴乾. 作煎, 勿令見風.” 라고 처음 수재되었고, 東醫寶鑑⁷⁾에는 性質이 따뜻하고, 맛은 쓰며 독이 없으며, 온갖 오래된 병과 부인의 崩漏에 주로 쓴다. 胎를 튼튼하게 하고 腹痛·赤白痢와 五臟痔로 피를 쏟는 것을 멎게 하며, 陰部의 疝癬瘡을 治療하고 새살이 돋게 하며, 風寒邪를 물리치고 妊娠을 할 수 있게 하는 것으로 알려져 있다.

*교신저자 : 한효상, 충남 금산군 추부면 대학로 201, 중부대학교 보건행정학과
· Tel : 041-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr
· 접수 : 2013년 4월 29일 · 수정 : 2013년 5월 6일 · 채택 : 2013년 5월 7일

A. argyi Lev. et Vant.의 성분으로 앞에는 정유 약 0.2~0.5%를 함유되어 있는데, 정유에는 cineole 약 50%, limonene, α -thujone, α -pinene, β -pinene, α -terpineneol 등이 함유되어 있다⁸⁾.

최근 한약제형의 다양화를 위한 시도 중에 한약 혹은 한약재를 발효하여 한약의 안전성을 확보면서 효능의 증대를 시도하거나 새로운 약효를 발굴하는 등의 다양한 연구들이 보고되고 있으며, *艾葉*을 발효하는 방법 개발이나 발효 *艾葉*의 효용성 증대에 대한 보고 또한 많이 이루어지고 있다^{9,10)}.

外用藥으로서의 *艾葉* 전탕액의 항균 효과¹¹⁾ 및 *艾葉* 추출물의 항산화작용¹²⁾에 대해서는 이미 많은 연구가 진행되고 있으나, 발효 *艾葉* 추출물이 인간 간암세포주 HepG2의 면역관련 활성 증진에 효과가 있을 것으로 추정되어 본 연구에서는 吐血, 衄血, 咯血, 便血, 崩漏, 妊娠下血, 月經不調, 痛經, 胎動不安, 心腹冷痛, 泄瀉久痢, 癱亂轉筋, 帶下, 濕疹, 疥癬, 痔瘡 등¹³⁾의 증상을 치료하는데 상용되고 있는 *艾葉* (*Artemisiae Argi Folium*)을 발효하여 얻은 추출물(AFL과 AFS)이 인간 간암세포주 HepG2 활성화에 미치는 영향을 알아보고 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 *艾葉*(*Artemisiae Argi Folium*)은 황해쪽 *A. argyi* Lev. et Vant.의 잎과 어린 줄기로, 충남 당진군 석문면 초록도에서 생산된 것을 구입하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 모든 약재는 쓰기 전에 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 세포는 human hepatocytes(HepG2 cell line)로서 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 α -Herbzyme(한국효소, Korea), 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) 등이 사용되었다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (NUAIRE, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), air compressor(Tamiya, Japan), homogenizer(Omni, USA), 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

발효 *艾葉*의 제조는 이미 보고한 선행연구¹⁴⁾의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다.

(1) *艾葉* 추출물 제조

艾葉 50 g을 정확하게 측정된 뒤 환류추출기에 1차 증류수 2,000 mL와 함께 넣은 뒤 탕액이 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 여과지(Advantec No.2, Japan)를 사용하여 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 3.7 g을 얻었으며, 수율은 7.4 %이었다.

(2) 발효 *艾葉* 추출물 제조

위에서 제조된 *艾葉* 추출물을 이용하여 다음과 같이 발효 *艾葉* 추출물을 제조하였다.

- ① 조효소 조제 : 조효소제인 α -Herbzyme 3 g에 증류수 100 mL를 가하고 37℃에서 30분간 침출하여 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.
- ② 열수추출하여 건조한 *艾葉*(3.0 g, pH:5.44)을 screw cap tube 0.95 g을 담고 미리 추출된 조효소액 2.2 mL를 첨가하여 37℃에서 2시간 효소반응하였다.
- ③ 효소반응 후 95℃에서 10분간 살균하였다.
- ④ *Lactobacillus pentosus* K34와 *Sacchomyces cerevisiae* STV89를 *艾葉*에 4 %씩 접종하여 *Lactobacillus pentosus* K34는 37℃에서 *Sacchomyces cerevisiae* STV89는 30℃에서 4일간 배양하였다.
- ⑤ 배양 후 60℃에서 20분간 열처리하였다.
- ⑥ *Lactobacillus pentosus* K34와 *Sacchomyces cerevisiae* STV89에서 배양 후 pH는 각각 5.42, 5.55였다.

2) 세포 배양

HepG2 cells은 37℃, 5 % CO₂ 조건에서 10 % FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 ug/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells은 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어준 후 50 mL flask 당 1 mL의 0.25 % trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37℃에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10 % FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50 mL culture flask)에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37℃, 5 % CO₂)에서 배양하였다.

3) 세포생존율 검사(Cell viability assay)

준비된 시료가 HepG2 cells의 세포생존율(cell viability)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Mosmann 등^{15,16)}의 방법을 응용하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 μ L씩 넣고 37℃, 5 % CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세

포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어준다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL를 각 well에 처리하고 3시간과 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 mg/mL MTT(Sigma, USA)를 100 µL씩 각 well에 처리하여 알루미늄호일로 차광시킨 후 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 µL 처리하고 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Hydrogen peroxide(H₂O₂) assay

세포내의 hydrogen peroxide(H₂O₂) 생성은 Roesler 등^{17,18)}의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 이용하여 측정하였다. DHR은 비형광이지만 세포 내에서 세포 내 H₂O₂에 의하여 산화되어 녹색의 형광을 발현하는 물질인 rhodamine 123(R123)로 바뀌게 된다. 그러므로 여러 가지 산화적 반응을 일으키는 물질들로 인해 인간의 HepG 2 cell내에서 발생하는 reactive oxygen species(ROS)의 수준을 dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 이용하여 측정할 수 있다. 96 well plate 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 µL씩 넣고 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(1×PBS) 용액으로 씻어 세척하였다. 시료는 처리하기 전에 DHR(10 µM)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하였다. 다양한 농도의 시료(10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 3시간과 24시간동안 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Nitric oxide(NO) 생성 측정

세포로부터 생성되는 nitric oxide의 양은 Weissman 등^{19,20)}의 방법을 응용, 세포배양액 중에 존재하는 NO²⁻를 그리스 시약(griess reagent)을 이용, 측정하였다. NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(griess reagent : 0.5 %의 설페닐아미드, 2.5 %의 인산 및 0.5 %의 나프틸에틸렌아민)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 NO 생성정도를 비교하였다. 다양한 농도의 시료(10, 50, 100, 200 µg/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 3시간과 24시간동안 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 µL을 채취하여 여기에 그리스 시약 100 µL을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

실험적정은 평균치 ± 표준편차(mean ± SD)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군의 평균의 차이는 Student's t-test

와 ANOVA test로 분석하여 P<0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. HepG2 cell의 세포생존율에 미치는 영향

AFL과 AFS가 HepG2 cell의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay 방법으로 비교하였다. AFL을 3 시간 처리한 결과 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 세포생존율은 각각 316.2±72.4%, 356.3±72.5%, 373.6±83.5%, 380.2±92.3%, 327.5±110.3% 로 10 µg/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 독성은 나타나지 않았고, AFL을 24 시간 처리한 결과 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 세포생존율은 각각 98.5±4.7%, 102.7±4.1%, 109.3±9.3%, 124.9±7.1%, 147.6±7.4% 로 100 µg/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

AFS를 3 시간 처리한 결과 10µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 세포생존율은 각각 446.2±131.0%, 486.2±150.6%, 542.3±149.8%, 583.5±147.0%, 604.4±220.4% 로, AFS를 24 시간 처리한 결과 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 세포생존율은 각각 116.5±8.8%, 117.7±10.0%, 138.0±14.9%, 143.1±11.6%, 158.7±5.7% 로 모두 10 µg/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 독성은 나타나지 않았다(Fig. 2).

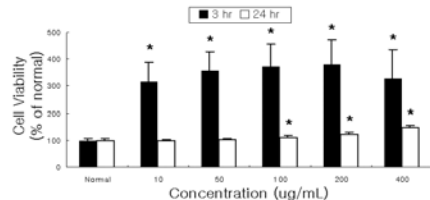


Fig. 1. Effect of AFL on cell viability of HepG2 cell. Cells were incubated with AFL(10, 50, 100, 200, 400 µg/mL) for 3 hr and 24 hr. Results are represented as mean±SD.

AFL : Water extract of Artemisiae Argyi Folium Fermented by *Lactobacillus pentosus* K34.

Normal : Not treated with AFL.

* represents P<0.05 compared to the normal.

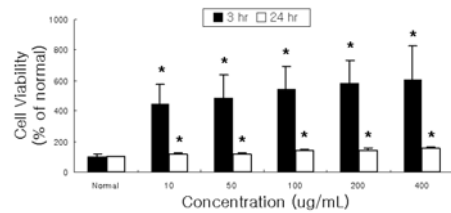


Fig. 2. Effect of AFS on cell viability of HepG2 cell. Cells were incubated with AFS(10, 50, 100, 200, 400 µg/mL) for 3 hr and 24 hr. Results are represented as mean±SD.

AFS : Water extract of Artemisiae Argyi Folium Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* STV89.

Normal : Not treated with AFS.

* represents P<0.05 compared to the normal.

3. Hydrogen peroxide(H2O2) 생성에 대한 영향

AFL과 AFS가 HepG2 cell의 hydrogen peroxide(H₂O₂) 생성에 미치는 영향을 비교하였다. AFL을 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 3 시간동안 배양한 결과, 세포내 H₂O₂ 생성률은 각각 97.6±7.0%, 101.6±7.8%, 109.6±6.1%, 119.5±2.9%, 124.4±2.7% 로 10 µg/mL 와 100 µg/mL 이상 일 때, AFL을 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 24시간동안 배양한 결과, 세포내 H₂O₂ 생성감소를 각각 101.5±3.2%, 103.3±2.9%, 105.9±2.9%, 115.0±3.7%, 132.4±3.4% 로 50 µg/mL 이상 일 때 유의(*P* < 0.05)하게 증가시켰다(Fig. 3).

AFS를 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 3시간동안 배양한 결과, 세포내 H₂O₂ 생성감소를 각각 99.3±5.2%, 102.9±5.7%, 109.6±5.0%, 118.2±5.6%, 132.6±7.9% 로, AFS를 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL 농도에서 24시간동안 배양한 결과, 세포내 H₂O₂ 생성률을 각각 99.4±1.3%, 103.7±2.2%, 107.6±2.0%, 126.0±19.0%, 142.0±4.2% 로 모두 50 µg/mL 이상 일 때 유의(*P* < 0.05)하게 증가시켰다(Fig. 4).

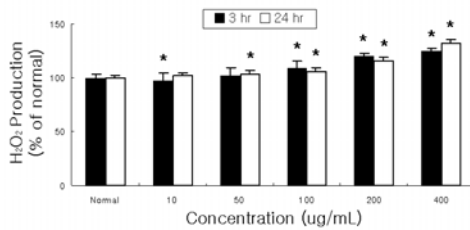


Fig. 3. Effect of AFL on the intracellular production of hydrogen peroxide(H₂O₂) of HepG2 cell. Cells were incubated with AFL(10, 50, 100, 200, 400 µg/mL) for 3 hr and 24 hr. Results are represented as mean±SD.
AFL : Water extract of *Artemisiae Argyi Folium* Fermented by *Lactobacillus pentosus* K34.
Normal : Not treated with AFL.
* represents *P* < 0.05 compared to the normal.

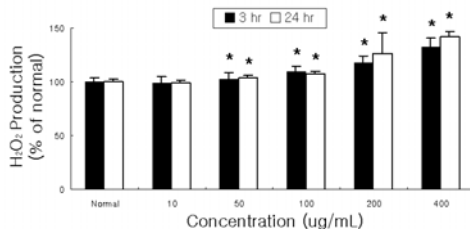


Fig. 4. Effect of AFS on the intracellular production of hydrogen peroxide(H₂O₂) of HepG2 cell. Cells were incubated with AFS(10, 50, 100, 200, 400 µg/mL) for 3 hr and 24 hr. Results are represented as mean±SD.
AFS : Water extract of *Artemisiae Argyi Folium* Fermented by *Sacchomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with AFS.
* represents *P* < 0.05 compared to the normal.

4. Nitric oxide(NO) 생성에 대한 영향

AFL과 AFS가 HepG2 cell의 nitric oxide(NO) 생성에 미

치는 영향을 비교하였다. AFL을 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도로 3시간 처리하였을 때 NO의 생성량은 각각 66.7±19.2%, 76.5±19.6%, 82.5±27.9%, 101.6±28.1% 로 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL 일 때 유의한 감소(*P* < 0.05)를 나타내었고, AFL을 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도로 24시간 처리하였을 때 NO의 생성량은 각각 89.3±3.8%, 93.6±13.9%, 91.8±4.0%, 97.5±3.8% 로 10 µg/mL, 100 µg/mL 일 때 감소를 나타내었다(Fig. 5).

AFS를 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도로 3시간 처리하였을 때 NO의 생성량은 각각 69.4±10.2%, 76.2±12.2%, 86.4±17.5%, 105.0±19.9% 로 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL 일 때 유의한 감소(*P* < 0.05)를 나타내었으나, AFL을 24시간 처리하였을 때는 Normal 군에 비해 변화가 나타나지 않았다(Fig. 6).

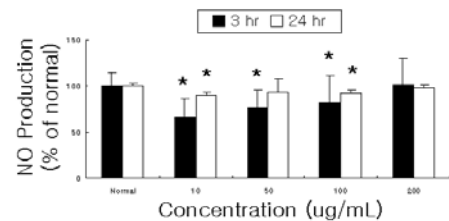


Fig. 5. Effect of AFL on the nitric oxide(NO) production of HepG2 cell. Cells were incubated with AFL(10, 50, 100, 200 µg/mL) for 3 hr and 24 hr. Results are represented as mean±SD.
AFL : Water extract of *Artemisiae Argyi Folium* Fermented by *Lactobacillus pentosus* K34.
Normal : Not treated with AFL.
* represents *P* < 0.05 compared to the normal.

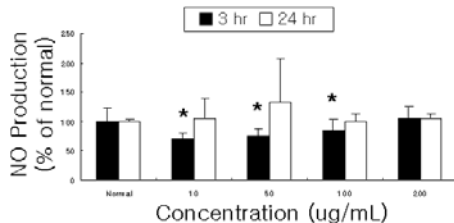


Fig. 6. Effect of AFS on the nitric oxide(NO) production of HepG2 cell. Cells were incubated with AFS(10, 50, 100, 200 µg/mL) for 3 hr and 24 hr. Results are represented as mean±SD.
AFS : Water extract of *Artemisiae Argyi Folium* Fermented by *Sacchomyces cerevisiae* STV89.
Normal : Not treated with AFS.
* represents *P* < 0.05 compared to the normal.

고찰

溫經止血藥에 속하는 艾葉(*Artemisiae Argy Folium*)의 기원 식물은 대한약전외한약(생약)규격집⁴⁾에 황해썩 *A. argyi* Lev. et Vant., 썩 *A. princeps* Pamp. var. *orientalis* Hara 또는 산썩 *A. montana* Pampani으로 되어 있으며, 性은 溫하고, 味는 辛苦하며, 小毒하다. 肝, 脾, 腎經으로 歸經하며 散寒止痛, 溫經止血하는 효능이 있어 少腹冷痛, 經寒不調, 子宮虛冷性不妊, 吐血, 衄血, 崩漏經多, 妊娠下血 등을 치료한다⁵⁾. 주요한 성분은 精油가 있으며, 精油 중에 cineol 이 25~30로 가장 많이 함유되어 있다. 특히 썩에 함유된

eupatilindms에는 抗潰瘍作用, 抗癌作用, 抗酸化作用, 항알러지作用 등이 있음이 밝혀졌다²¹⁾. 또한 艾葉에는 鎮咳, 祛痰, 平喘作用, 抗血液凝固作用, 免疫增强作用, 抗菌作用, 利痰作用, 자유기 소거 작용 등이 알려져 있다⁸⁾.

발효는 효소의 작용을 이용하여 약물을 발효시켜 그 원래의 성질을 바꾸거나 새로운 치료효과를 나타내게 하여 임상에서의 목적에 맞추도록 만드는 방법으로²²⁾, 발효 한약은 한약재 약효성분의 체내 흡수율과 생체 이용률을 모두 극대화시킨 것이며, 한약의 효능을 확대하고, 안전성을 제고한 것이다²³⁾. 곰팡이나 미생물을 이용하여 약재를 발효시키면 원래의 성질이 변하여 새로운 치료 작용을 나타내는 약물을 얻을 수 있어, 주로 神麴 등 소화건위약들에 사용하며, 半夏麴 등 자극성이나 독성이 있는 약재들의 독성을 완화시키기 위해서 발효시켜 쓰기도 한다³⁾.

발효 한약의 추출물은 적절한 균주를 사용하면 세포 독성을 감소시키면서 면역 조절의 효능을 발휘할 수 있다²⁴⁾. 그러나 아직 개별 한약재, 혹은 한약처방을 발효시킨 시료에 대한 면역세포 활성 연구가 많이 이루어지지 않고 있으며, 효능과 약리작용에 있어서 연관성을 가진 약재들의 발효 혼합물이 면역 활성에 미치는 효과에 대한 연구 또한 아직 다양하게 시도되지 못하여 왔다.

이에 著者は 발효한약의 유의성을 적용하여 艾葉을 발효 추출한 후 각 각의 추출물 AFL과 AFS로 인간 HepG2 cell을 이용한 세포 생존율, 세포내 ROS 생성 그리고 NO 생성에 미치는 영향을 측정하였다.

발효미생물은 빠른 增殖性, 물질의 資化性, 다양한 화학활성과 반응의 特異性, 인공변이의 容易性, 높은 均一性, 고온 고압의 不必要 등의 특징을 갖고 있어²⁵⁾ 본 실험에서는 AFL은 *Lactobacillus pentosus* K34(유산균)를 균주로 이용하여 발효하였고, AFS는 *Sacchromyces cerevisiae* STV89(효모)를 균주로 이용하여 발효하였다. 이러한 *Lactobacillus pentosus* K34(유산균)와 *Sacchromyces cerevisiae* STV89(효모) 균주의 특성상 차이와 관련하여 발효균주에 따른 발효 효과의 차이를 알아보기 위하여 실험을 AFL과 AFS로 나누어 진행하였다.

본 연구에서는 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)으로부터 분양받은 HepG2 cells에 발효 艾葉 추출물을 10, 50, 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리한 뒤에 3시간과 24시간 동안 37℃에서 배양한 후, 세포의 증식을 MTT assay를 이용하여 확인한 결과 대조군에 비하여 발효 艾葉 추출물의 농도가 증가함에 따라 HepG2 cells에 세포생존율 증가를 나타내었으며, 특히 3시간 처리군에서 세포생존율이 유의적으로 증가해 가장 효과적임이 관찰되었으나, 시간별 처리군에 대한 세포생존율은 좀 더 경시적 연구가 필요할 것으로 사료된다. 세포생존율이 증가하였다는 것은 세포독성을 과도히 유발하지 않은 것으로 볼 수 있다. 이는 발효 艾葉 추출물이 간조직 손상복구에 유의성을 가질 수 있음을 의미한다.

ROS(reactive oxygen species, 활성산소종)는 자유전자를 가진 산소화합물로, 박테리아나 바이러스를 퇴치시키는 면역 작용을 한다. 하지만 면역 작용 후 남아 있는 ROS는 전자를 띠고 있어 불안정한 자신을 안정시키고자 세포막의 구성 성분인 지질 단백질이나 세포 내 DNA를 공격하여 세포를 손상시킴으로써 암, 당뇨, 노화질환과 같은 만성질환의 주요 요인

중 하나로 작용한다. 여러 가지 ROS 중 하나인 OHP(organic hydroperoxide)는 반응성이 매우 높은 물질로 지질과산화와 심혈관 질병을 일으키며, 과도한 OHP 생성은 여러 가지 만성질환 발병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. AFL이 HepG2 cell의 hydrogen peroxide(H₂O₂) 생성에 미치는 영향 비교에서 3시간에서는 10 μg/mL 와 100 μg/mL 이상 일 때, 24시간에서는 50 μg/mL 이상 일 때 증가를 나타내었으며, AFS가 HepG2 cell의 hydrogen peroxide(H₂O₂) 생성에 미치는 영향 비교하였는데 3시간과 24시간 모두 50 μg/mL 이상 일 때 증가를 나타내었다. 이렇게 AFL과 AFS에 의해 HepG2 cell의 H₂O₂ 생성이 증가함은 AFL과 AFS가 자가면역질환 증상개선의 가능성과 식균작용이 있음을 의미하는 것이다.

산화 질소(nitric oxide, NO)는 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대한 면역기능 등이 있지만, 과량이 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용한다²⁷⁾. 또한 생체 내에서 일어나는 염증 반응의 조절은 매우 복잡한 것으로 알려져 있는데 염증 과정 중에는 염증유도 cytokine류와 함께 많은 양의 NO가 생성되는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. AFL이 HepG2 cell의 nitric oxide(NO) 생성에 미치는 영향을 비교하였는데 3시간에서는 10 μg/mL 이상 일 때 감소를 나타내었고, 24시간에서는 10 μg/mL, 100 μg/mL 일 때 감소를 나타내었다. AFS가 HepG2 cell의 nitric oxide(NO) 생성에 미치는 영향을 비교했을 때 3시간에서는 10 μg/mL 이상 일 때 감소하였으나 24시간에서는 정상군에 비해 변화가 나타나지 않았다. AFL과 AFS가 동일조건에서 배양 3 시간, 24시간에서 생성량이 현저히 감소했던 NO 생성은 AFL에서는 24시간 처리했을 때 변화가 나타나지 않은 것은 발효균주에 따른 발효 효과의 차이로 사료된다. 이와 같이 AFL과 AFS에 의해 HepG2 cell의 NO 배출증가를 억제함은 AFL과 AFS가 염증악화를 억제할 수 있는 효능이 있음을 의미한다.

이상의 결과, 발효 艾葉 추출물 AFL과 AFS는 HepG2 cell에 세포독성을 과도히 유발하지 않으면서 간조직세포의 ROS의 생성을 증가시키고 NO 생성을 감소시키는 등 자가면역질환, 염증질환의 악화를 완화할 수 있는 효과가 있음을 나타내는 것이다. 앞으로 발효 艾葉 추출물의 면역강화작용에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

결론

艾葉을 *Lactobacillus pentosus* K34(유산균)와 *Sacchromyces cerevisiae* STV89(효모)로 발효 추출한 후 각 각의 추출물 AFL과 AFS로 인간 HepG2 cell의 생존율, 세포내 ROS 생성 그리고 NO 생성에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 발효 艾葉 추출물은 HepG2 cell과 3시간, 24시간 동안 함께 배양한 후 MTT assay를 수행한 결과 AFL은 각각 10 μg/mL, 100 μg/mL 이상의 모든 농도에서 유의하게 독성이 없는 것으로 나타났고, AFS는 모두 10 μg/mL

이상의 모든 농도에서 유의하게 독성이 없는 것으로 나타났다.

2. 발효 艾葉 추출물은 HepG2 cell의 세포내 ROS 생성증가를 3시간, 24시간에서 AFL은 각각 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상 농도 일 때, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도 일 때 증가시켰고, AFS는 모두 50 $\mu\text{g/mL}$ 이상 농도 일 때 유의하게 증가시켰다.
3. 발효 艾葉 추출물은 HepG2 cell과 3시간, 24시간의 배양에서 NO 생성을 AFL은 각각 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상 농도 일 때, 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도 일 때 억제시켰고, AFS는 3시간 배양에서 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상 농도 일 때 유의하게 억제시켰다.

이상의 결과, 발효 艾葉 추출물 AFL과 AFS는 HepG2 cell에 세포독성을 과도하게 유발하지 않으면서 HepG2 cell의 ROS 생성을 증가시키고 NO 생성을 감소시키는 등 자가면역질환, 염증질환의 증상개선제로서의 응용가능성이 있음을 나타내는 것이며, 앞으로 발효 艾葉 추출물의 면역강화작용에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

References

1. Shon MY. Antioxidant and Anticancer Activities of *Poria cocos* and *Machilus thunbergii* Fermented with Mycelial Mushrooms. Food Industry and Nutrition. 2007 ; 12(2) : 51-7.
2. Choi JH, Kim HM, Song YS, Park SG, Kim JJ, Lee CK. Physiological Effects of the Cosmetic Product Containing of *Saccharomyces* Fermented Modified *Kyungohkgo* Extract on Human Skin. Kor J Herbology. 2007 ; 22(4) : 227-32.
3. Park CH, Kang SI. Hanyakjaepojaegisul. Seoul : ChengmoonGak. 2002 : 79-80.
4. Korea Food and Drug Administration. The Korean Herbal Pharmacopoeia. Seoul, Korea Food and Drug Administration. 2012 : 237.
5. 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 : 447-8.
6. Rao HJ. Mingyibieliu. Beijing : Renminweisheng publisher. 1986 : 155-6.
7. Heo J. Dongeuibogam. Hadong : Dongeuibogam publisher. 2010 : 2180.
8. Kim HC. Hanyakyakrihak. Seoul : Jipmoondang. 2001 : 309-11.
9. Park WS. Effect of *Artemisiae Argi Folium* Fermented with *Lactobacillus Pentosus* on Hydrogen Peroxide Production of Macrophage Treated with Toxicants. Korean J Oriental Physiol Pathol. 2009 ; 23(2) : 438-42.
10. Park WS, Kim DH. Effect of Mixture of Fermented *Artemisiae Argi Folium* and Fermented *Sophorae Radix* on Hydrogen Peroxide Production within Mouse Macrophage Raw 264.7 with EtOH and Nicotine. Korean J Oriental Physiol Pathol. 2008 ; 22(5) : 1293-8.
11. Yang SY, Lee KS, Song BG. The experimental study on *Folium Artemisiae Argyi* applied in the treatment of women's genital disease and fluor genitalis. Korean J Oriental Gynecol. 1989 ; 3(1) : 48-52.
12. Park SH, Cho DM, Choi GL, Choi YJ, Choi JH. Antioxidative Effects of Mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) Extracts Diet on ICR Mouse Skin. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2007 ; 36(12) : 1523-8.
13. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. Zhonghuabencao. Vol. 7. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1999 : 668-75.
14. Han HS, Park WS, Lee YJ. Studies on the Immuno Modulating Acitivity of Fermented *Artemisiae Argyi Folium* Extract. Kor J Herbology. 2008 ; 23(3) : 103-12.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 ; 65(1-2) : 55-63.
16. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. J Immunol Methods. 1990 ; 131(2) : 165-72.
17. Roesler J, Hecht M, Freiherst J, Lohmann-Matthes ML, Emmendorffer A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytometry. European J Pediatrics. 1991 ; 150(3) : 161-5.
18. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. Nitric Oxide. 1997 ; 1(2) : 145-57.
19. Weissman BA, Gross SS. Measurement of NO and NO synthase. Curr Protoc Neurosci. 2001 ; 7(7) : 13.
20. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. Methods in Enzymol. 2008 ; 440 : 361-80.

21. Choi HJ, Kim EJ, Han MJ, Back NI, Kim DH, Jung HG, Kim NJ. Hepatoprotective Effect of Fermented *Artemisia princeps* PAMPANINI by Lactic Acid Bacteria. *Kor J Pharmacogn*, 2007 ; 38(3) : 245-53.
22. Chae US. *Hanuihakgaeron*. Seoul : Daeseoungmunhwasa, 1997 : 294.
23. 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 Oriental Physiol Pathol*. 2007 ; 21(2) : 387-91.
24. 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.
25. Sung NG, Park YJ, Jung JH, Lee JG. *Balhyogonghak*. Seoul : HyungSeol publisher, 1995 : 14-5.
26. Society data. Fluorescent Probe for Visualization of Organic Hydroperoxides. *NICE*. 2011 ; 29(1) : 28-9.
27. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001 ; 282(5) : 1075-9.
28. Byun SH, Yang CH, Kim SC. Inhibitory effect of *Scrophulariae Radix* extract on $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. *Kor J Herbology*. 2005 ; 20(2) : 7-16.