

마우스 대식세포를 이용한 어성초(魚腥草) 물추출물의 항염효능연구

황인승^{1#}, 김영진¹, 박윤수¹, 김현주¹, 김도훈², 박완수^{1*}

1 : 가천대학교 한의과대학 병리학교실, 2 : 가천대학교 한의과대학 원전외사학교실

Anti-inflammatory Effect of Houttuyniae Herba Water Extract on LPS-induced RAW 264.7 Mouse Macrophages

In Seung Hwang^{1#}, Young Jin Kim¹, Yun Soo Park¹, Hyun Ju Kim¹, Do Hoon Kim², Wan Su Park^{1*}

1 : Department of Pathology, College of Korean Medicine, Gachon University,

2 : Department of Oriental Medical Classics & History, College of Korean Medicine, Gachon University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate effects of Houttuyniae Herba water extract (HC) on calcium release and production of various inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), interferon-inducible protein (IP)-10, platelet derived growth factor (PDGF)-BB, keratinocyte-derived chemokine (KC), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin (IL)-4, and IL-5 in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 mouse macrophages.

Methods : NO production was measured by Griess reagent assay. Intracellular calcium level was measured with Fluo-4 assay. Levels of cytokines were measured by High-throughput multiplex bead array cytokine assay based on xMAP (multi-analyte profiling beads) technology.

Results : HC significantly decreased NO production for 24 hrs incubation at the concentrations of 10, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in LPS-induced RAW 264.7 ($P < 0.05$). HC significantly decreased production of IP-10, KC, VEGF, and PDGF-BB for 24 hrs incubation at the concentrations of 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in LPS-induced RAW 264.7 ($P < 0.05$). HC also significantly decreased intracellular calcium release for 24 hrs incubation at the concentrations of 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in LPS-induced RAW 264.7 ($P < 0.05$). But HC did not show any significant effect on production of IL-4 and IL-5 in LPS-induced RAW 264.7.

Conclusions : The results suggested that HC has anti-inflammatory property related with its inhibition on the production of NO, IP-10, KC, VEGF, and PDGF-BB in LPS-induced macrophages via calcium pathway.

Key words : Houttuyniae Herba, Macrophage, Inflammation, Cytokine, Nitric oxide, Calcium

서 론

염증(炎症, inflammation)이란 외부상처 혹은 국소적 손상을 통하여 체내에서 일어나는 복잡한 반응으로서 홍색의 색깔을 띄우고(발적; redness), 부어오르며(종창; swelling), 열이 나고(발열; heat), 통증(pain) 등의 증상을 수반하는 데 이러한 염증반응과 관련된 면역세포 중에 대표적인 것이 대식세포(macrophage)이다. 대식세포는 감염체나 비정상적인 세포부

산물 등으로부터 자극을 받으면 사이토카인(cytokine)이나 일산화질소(nitric oxide; NO)와 같은 염증매개물질을 방출하여 염증반응을 유발하는 데, 제어되지 못하는 과잉의 염증반응은 급만성의 각종 염증질환의 발생과 연관되어진다. 급만성의 염증질환치료를 위해 최근에는 한약들이 나타내는 염증조절작용에 대한 관심이 증대되고 있다.

어성초(魚腥草)는 삼백초과(saururaceae)에 속하는 다년생 초본(多年生草本)인 약모밀(*Houttuynia cordata* thunb)의

*교신저자 : 박완수. 경기도 성남시 수정구 복정동 가천대학교 한의과대학 병리학교실.

· Tel : 031-750-8821 · E-mail : HANGL98@naver.com

#제1저자 : 황인승. 경기도 성남시 수정구 복정동 가천대학교 한의과대학 병리학교실.

· Tel : 031-750-5412 · E-mail : his8901@naver.com

· 접수 : 2014년 6월 15일 · 수정 : 2014년 7월 17일 · 채택 : 2014년 7월 17일

전초(全草)이다¹⁻²⁾. 『名醫別錄』(下品)에는 즈(載)으로 기록되어 있다³⁾. 어성초(魚腥草)라는 이름은 줄기와 잎에서 물고기 비린내가 난다고 하여 붙여진 명칭인데 신선한 것에서 향취가 더 강하다⁴⁻⁵⁾. 어성초(魚腥草)는 따뜻하고 습윤한 기후를 좋아하며 그늘지고, 축축한 땅이나 물가에서 자라며¹⁻⁶⁾, 지역에 따라 차이는 있으나 보통 4월경에 싹이 트고, 초여름에 꽃이 피며, 결실기는 10-11월이다¹⁻⁶⁾. 여름철에 경엽(莖葉)이 무성하고, 화수(花穗)가 많을 때 채취하여 햇볕에 말린 후 절단하여 약용(藥用)으로 사용한다¹⁻⁶⁾. 우리나라에서는 중부지방에서 자생 또는 재배되고 있으며, 중국에서는 장강(長江) 이남의 각(各) 성(省)에 분포한다¹⁾. 어성초(魚腥草)의 성(性)은 한(寒)하고, 미(味)는 신(辛)하며, 폐(肺)와 간(肝)으로 귀경(歸經)한다¹⁻⁶⁾. 청열해독(淸熱解毒), 이뇨소종(利尿消腫)하는 효능을 가지고 있어서 폐렴(肺炎), 폐농양(肺膿瘍), 열리(熱痢), 학질(瘡疾), 수종(水腫), 임병(淋病), 백대(白帶), 웅종(癰腫), 치질(痔疾), 탈항(脫肛), 습진(濕疹), 개선(疥癬) 등을 주로 치료한다¹⁻⁶⁾. 약리작용으로는 항균작용(抗菌作用), 면역증강작용(免疫增強作用), 항염증작용(抗炎症作用), 이뇨작용(利尿作用), 진해작용(鎮咳作用)이 있는 것으로 알려져 있다^{1,7-11)}.

이에 본 연구진은 어성초(魚腥草) 물추출물의 세포독성과 항염활성에 미치는 효과를 검증해보고자 어성초(魚腥草)를 열수추출하여 제조한 시료(HC)를 대상으로 마우스 대식세포 RAW 264.7의 세포생존율(cell viability)과 지질다당체(lipopolysaccharide; LPS)로 유발된 RAW 264.7의 NO, 세포내 calcium, interferon-inducible protein(IP)-10, platelet derived growth factor(PDGF)-BB, keratinocyte-derived chemokine(KC), vascular endothelial growth factor(VEGF) 등의 염증촉발인자(proinflammatory mediators) 방출증가에 미치는 영향을 조사하여 유의한 항염활성 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), penicillin and streptomycin, phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)은 Gibco BRL(NY, USA)에서, multiplex cytokine assay kit는 Panomics(CA, USA)에서 구입하였으며, 기타 시약은 Sigma-Aldrich사(MO, USA)에서 구입하였으며, 사용된 기기는 research microscope(Becton dickinson, USA), centrifuge(Gyrozen, Korea), CO₂ incubator(NUAIRE, USA), clean bench(Jeiothec, Korea), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), water bath(Sae Han, Korea), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), freeze dryer(Eyela, Japan), deep freezer(Gudero, Ilshin Lab, Korea), Microplate Reader(Bio-Rad, USA), spectrofluorometer(Dynex, UK), Bio-plex 200(Bio-Rad, USA) 등이다.

2) 약재

본 연구에 사용된 어성초(魚腥草)는 움니허브 제약회사(대구, 한국)로부터 구입하였으며, 실험 전에 깨끗이 세척한 후 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

어성초(魚腥草) 50 g을 정확하게 중량을 측정된 후 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 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말(수율: 17.08%)을 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% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 배양되었으며, 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(Sigma, USA) 용액으로 씻어주었고, 충분히 증식되면, 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관한 뒤, 세포를 탈착하여 계대 배양하였으며, 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음, 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다¹²⁻¹⁵⁾.

4) NO 생성의 측정

LPS를 단독처리하거나 혹은 다양한 농도의 시료와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 µL을 채취하여 여기에 그리스 시약 100 µL를 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 Microplate Reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정, 비교하였다^{13-14,17-18)}.

5) 세포내 calcium의 측정

LPS에 의해서 유발되는 RAW 264.7의 세포내 칼슘증가에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위하여 Fluo-4 calcium assay를 다음과 같이 실시하였다. LPS 단독 혹은 다양한 농도의 시료와 함께 배지에 담아 세포가 분주되어 있는 96well plate의 각 well에 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하고, 배양이 끝난 후 세포배양액을 버리고 100 µL의 Fluo-4 dye loading solution을 37°C에서 30분간 처리한 뒤, spectrofluorometer(excitation 485 nm; emission 535 nm)를 이용하여 세포내 칼슘의 양을 측정, 비교하였다¹⁷⁻¹⁸⁾.

6) 멀티플렉스 사이토카인 분석(multiplex cytokine assay)

96 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주되도록 1×10^5 cells/mL의 cell을 100 μ L씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후, 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS용액으로 씻어준 뒤, LPS(1 μ g/mL) 단독 혹은 배지에 녹인 시료와 함께 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양 후 상층액을 채취하여 멀티플렉스어세이를 실시하였는데, 세포배양 상층액을 분주하기 전에 96 well plate 타입의 Filter plate를 wash buffer로 세척 후, 특정항체가 결합되어 있는 beads를 분주한 후 다시 한번 wash buffer로 세척하고 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 준비된 세포 배양상층액과 표준물질(standard antibody)을 각 well에 50 μ L씩 분주하였고, 분주가 끝나면 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한 뒤에, wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시하였으며, 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 혼합된 Detection Antibody를 각 well에 25 μ L씩 분주하고 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한 뒤에, wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시하였고, 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 잘 섞인 Streptavidin-PE를 각 well에 50 μ L씩 분주하고 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한 뒤에, wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시하고 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 각 well에 Reading buffer를 120 μ L씩 분주하고 실온에서 5분간 500rpm의 속도로 shaking한 후 Bioplex-200을 이용, 각 cytokine의 생성수준을 측정, 비교하였다¹⁵⁻¹⁸⁾.

3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 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. RAW 264.7의 세포생존율에 미치는 영향

HC가 RAW 264.7 세포들의 세포생존율에 미치는 영향을 비교하였다. 24시간 처리한 결과 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 유의한 감소는 나타나지 않았다(Fig. 1).

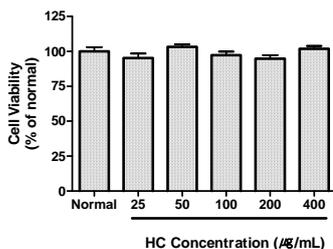


Fig. 1. Effect of HC on cell viability in RAW 264.7 cells. HC : Water extract of Houttuyniae Herba. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean ± SD of more than three independent experiments. Normal : Normal group treated with culture medium only.

2. LPS로 촉발된 RAW 264.7의 NO 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 μ g/mL) 단독 혹은 준비된 시료 HC(10, 25, 50, 100, 200 μ g/mL)와 함께 RAW 264.7 세포들을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 NO 생성증가를 HC가 10 μ g/mL 이상의 농도에서 모두 유의(P < 0.05)하게 감소시켰다(Fig. 2).

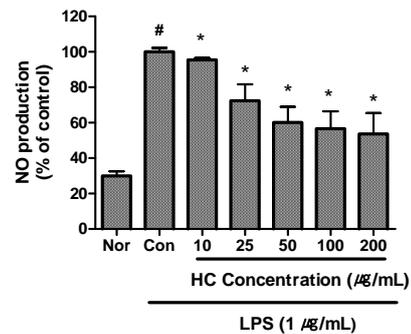


Fig. 2. Effect of HC on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean ± SD of more than three independent experiments. Nor : Normal group treated with culture medium only. Con : Control group treated with LPS only. # represents P < 0.05 compared to Normal. * represents P < 0.05 compared to Control.

3. LPS로 촉발된 RAW 264.7의 calcium 증가에 미치는 영향

LPS(1 μ g/mL) 단독 혹은 준비된 시료 HC(25, 50, 100, 200 μ g/mL)와 함께 RAW 264.7 세포들을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 세포내 calcium 증가를 HC가 25 μ g/mL 이상의 농도에서 모두 유의(P < 0.05)하게 감소시켰다(Fig. 3).

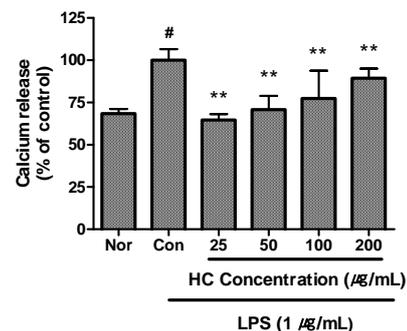


Fig. 3. Effect of HC on calcium production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean ± SD of more than three independent experiments. Nor : Normal group treated with culture medium only. Con : Control group treated with LPS only. # represents P < 0.05 compared to Normal. * represents P < 0.05 compared to Control.

4. LPS로 촉발된 RAW 264.7의 KC 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 혹은 준비된 시료 HC(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 RAW 264.7 세포들을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 KC 증가를 HC가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 모두 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 4).

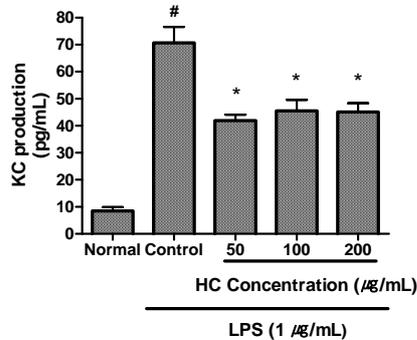


Fig. 4. Effect of HC on KC production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Normal : Normal group treated with culture medium only. Control : Control group treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to Normal. * represents $P < 0.05$ compared to Control.

5. LPS로 촉발된 RAW 264.7의 IP-10 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 혹은 준비된 시료 HC(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 RAW 264.7 세포들을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IP-10 생성증가를 HC가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 모두 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 5).

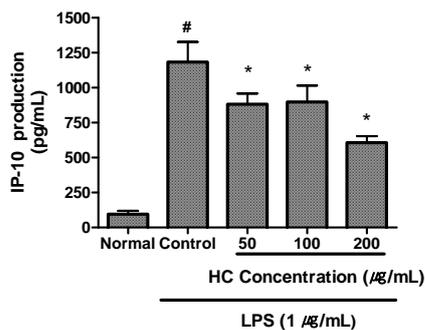


Fig. 5. Effect of HC on IP-10 production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Normal : Normal group treated with culture medium only. Control : Control group treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to Normal. * represents $P < 0.05$ compared to Control.

6. LPS로 촉발된 RAW 264.7의 VEGF 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 혹은 준비된 시료 HC(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 RAW 264.7 세포들을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 VEGF 생성증가를 HC가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상

의 농도에서 모두 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 6).

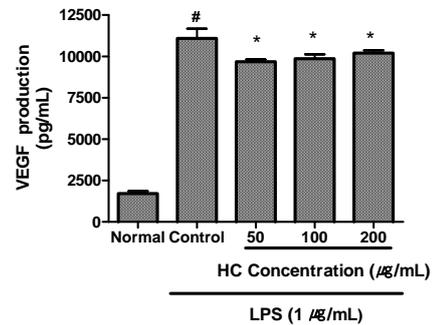


Fig. 6. Effect of HC on VEGF production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Normal : Normal group treated with culture medium only. Control : Control group treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to Normal. * represents $P < 0.05$ compared to Control.

7. LPS로 촉발된 RAW 264.7의 PDGF-BB 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 혹은 준비된 시료 HC(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 RAW 264.7 세포들을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 PDGF-BB 생성증가를 HC가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 모두 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 7).

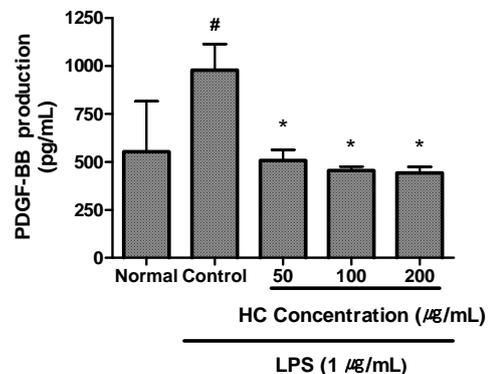


Fig. 7. Effect of HC on PDGF-BB production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Normal : Normal group treated with culture medium only. Control : Control group treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to Normal. * represents $P < 0.05$ compared to Control.

8. LPS로 촉발된 RAW 264.7의 IL-4 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 혹은 준비된 시료 HC(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 함께 RAW 264.7 세포들을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-4 생성증가에 대하여 HC는 유의한 영향을 나타내지 않았다(Fig. 8).

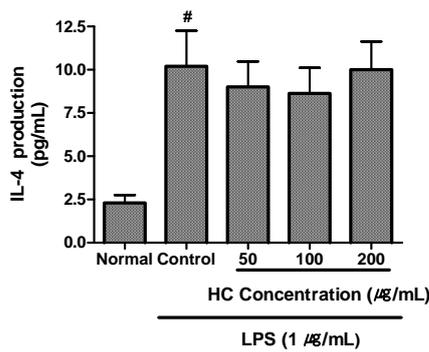


Fig. 8. Effect of HC on IL-4 production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean ± SD of more than three independent experiments. Normal : Normal group treated with culture medium only. Control : Control group treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to Normal.

9. LPS로 촉발된 RAW 264.7의 IL-5 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 µg/mL) 단독 혹은 준비된 시료 HC(50, 100, 200 µg/mL)와 함께 RAW 264.7 세포들을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-5 생성증가에 대하여 HC는 유의한 영향을 나타내지 않았다(Fig. 9).

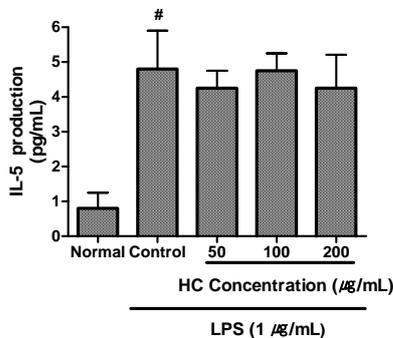


Fig. 9. Effect of HC on IL-5 production in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 24 hrs. Results are represented as mean ± SD of more than three independent experiments. Normal : Normal group treated with culture medium only. Control : Control group treated with LPS only. # represents $P < 0.05$ compared to Normal.

고찰

어성초(魚腥草)는 삼백초과(三白草科)(saururaceae)에 속하는 다년생초본(多年生草本)인 약모밀(Houttuynia cordata Thunb)의 전초(全草)로 『名醫別錄』 下品에 薺(薺)¹¹⁾으로 기록되어 “薺微辛微溫 蠅蝮溺瘡 多食令人氣喘” 이라한 것이 문헌적 효시이다. 어성초(魚腥草)의 성분(成分)으로는 decanoyl acetaldehyde, methyl-n-nonylketone, myrcene, lauric aldehyde, capric acid 등이 들어있다¹⁾. 화수 및 과수에는 isoquercitrin이 있고 잎에는 quercitrin이 들어있으며, 꽃, 잎, 열매에는 flavonoid, quercetin, quercitrin, isoquercitrin,

reynoutrin, hyperin이 들어있다¹⁾.

어성초에는 청혈해독(淸熱解毒), 청리습열(淸利濕熱), 이뇨통림(利尿通淋), 소종(消腫)하는 효능(效能)과 항균작용(抗菌作用), 항병독작용(抗病毒作用), 이뇨작용(利尿作用), 진통작용(鎮痛作用), 지혈작용(止血作用)과 진해작용(鎮咳作用), 항종양효과(抗腫瘍效果)가 있는 것으로 알려져 있다¹⁻¹⁰⁾. 폐렴(肺炎;pneumonia), 폐농양(肺膿瘍;pulmonary abscess), 열리(熱痢;fever dysentery), 학질(瘧疾;malaria), 수종(水腫;edema), 임병(淋病;gonococcal), 백대(白帶;leucorrhoea), 용종(癭腫;tumor), 치질(痔疾;haemorrhoids), 탈항(脫肛;prolapse of the anus), 습진(濕疹;eczema), 개선(疥癬;scabies) 등의 증상을 치료한다¹⁻⁵⁾.

어성초(魚腥草)에 관한 연구로는 최근에 정 등¹⁹⁾이 어성초 60% 메탄올 추출물을 이용하여 DPPH assay, ABTS radical 소거활성 및 FRAP assay, MTT assay, LDH assay 등을 실시한 결과 quercitrin 등 다양한 페놀성 화합물(총 페놀 화합물 함량; 17.71 mg/g)을 함유한 어성초 60% 메탄올 추출물이 DPPH와 ABTS radical 소거활성 및 FRAP assay에서 농도 의존적으로 높은 항산화 활성을 보여주었으며, MTT assay에서는 vitamin C와 유사한 세포생존율을 나타내었고, LDH assay에서는 농도 의존적으로 효소방출량이 감소됨이 관찰되었으며, 뇌조직을 이용한 지질의 과산화 억제활성을 측정된 결과에서도 농도 의존적으로 지질의 과산화가 억제되는 것을 확인하는 보고를 한 바 있다. 이러한 보고는 곧 어성초(魚腥草)가 신경의 산화적 손상으로부터 야기되는 퇴행성 뇌신경질환 등을 억제할 수 있음을 의미하는 것이다. 또한 정 등²⁰⁾은 어성초가 자궁근종 세포의 성장억제와 세포자멸사에 미치는 영향에 대한 연구보고를 한 바 있는데, 주요 내용으로는 일차배양 사람 자궁근종 세포를 어성초로 처리한 결과, 세포생존도가 용량의존적으로 영향을 받았으며, Sub G1 정지가 유도되었고, caspase-3의 활성화와 Bcl-2의 하향조절이 증가하는 등 어성초가 자궁근종세포의 세포 성장을 억제하고 세포사멸을 유도함에 대한 것이었다.

외부로부터 세균과 같은 병원체성 감염원의 침입에 대응하거나, 노후화된 자가세포를 제거하기 위해서 인체는 면역시스템을 갖추고 있으며, 이러한 인체 면역시스템에 총괄적으로 간여되는 대표적인 세포가 대식세포(大食細胞; macrophage)이다. 대식세포는 다양한 염증매개물질을 방출해서 다른 면역세포들, 예를 들면 T-세포 등의 림프구나 중성구, 호염기구, 호중구 등의 과립구에 기능활성화를 위한 신호를 보내게 된다. 대식세포가 방출하는 염증매개물질에는 인터루킨, 종양괴사인자, 인터페론과 같은 전형적인 사이토카인(cytokine)류와, IP-10과 KC 등과 같은 케모카인(chemokine)류, 그리고 PDGF나 VEGF와 같은 성장인자(growth factor)류 등의 면역단백질들이 있으며, 이와는 별도로 일산화질소(nitric oxide), 하이드로젠 퍼옥사이드(hydrogen peroxide) 등의 저분자성 물질들도 포함된다. 인터루킨(interleukin)은 사이토카인에 속하는 것으로 패혈증과 같은 급성염증질환 뿐만 아니라 류마티스관절염이나 전신성홍반성낭창과 같은 자가면역성질환, 퇴행성뇌질환과 같은 만성염증성질환의 발생 및 증상악화에도 관여되는 것으로 알려져 있으며, 케모카인은 주화성반응(chemotaxis)을 유발하는 작은 분자량의 단백질로서 염증유발부위로 관련된 면역세포들이 집중되도록 하는 작용을 하지

만, 과도한 케모카인의 증가는 폐렴, 천식, 아토피피부염, 동맥경화증 등을 악화시키는 것으로 알려져 있다^{15-18,21-23}.

최근 LPS로 유발된 마우스 RAW 264.7 cells의 NO, IP-10, KC, VEGF 등의 염증매개물질 생성증가를 황금(黃芩) 물추출물이 유의하게 억제함에 대한 윤의 보고²⁴ 등, 한약의 염증조절효능에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나, 아직까지 대식세포의 염증매개물질방출과 관련된 어성초의 항염작용에 대한 자세한 연구는 보고되지 않고 있다. 다만 김²⁵이 어성초에서 추출한 성분들이 LPS로 유발된 RAW 264.7 cells의 NO, PGE₂, IL-1 β , TNF- α 등의 염증매개물질 생성증가를 유의하게 억제함에 대해서는 이미 보고한 바 있고, 이 등²⁶은 발효어성초가 LPS로 유발된 RAW 264.7 cells의 NO, IL-17, IP-10, Eotaxin 생성증가를 유의하게 억제함에 대해 보고한 바 있다.

이에 본 연구에서는 清熱解毒效能을 가지고 있는 어성초를 물추출하여 제조한 시료(HC)를 대상으로 mouse macrophage RAW 264.7 cells의 cell viability, 그리고 LPS에 의해서 유발되는 마우스 RAW 264.7 cells의 NO 생성증가, 세포내 calcium 증가, IP-10, PDGF-BB, KC, VEGF와 같은 염증촉발물질(proinflammatory mediators)의 생성증가에 미치는 효과를 조사하였다.

HC가 macrophage의 세포 생존율에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간 동안 처리한 결과 25, 50, 100, 200, 400 μ g/mL의 모든 농도에서 유의한 생존율감소는 나타나지 않았으므로 세포독성은 없는 것으로 판단하였다. HC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 NO 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과에서는 10 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 NO 생성증가를 유의하게 억제시켰으며, LPS로 유발된 마우스 대식세포의 세포내 calcium 증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과에서는 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 LPS에 의한 세포내 calcium 증가를 유의하게 억제시켰다.

HC가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 KC, IP-10, VEGF, PDGF-BB 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과에서는 50, 100, 200 μ g/mL의 모든 농도에서 모두 LPS에 의한 생성증가를 유의하게 억제시켰다. 이는 김²⁵이 어성초에서 추출한 성분들이 LPS로 유발된 RAW 264.7 cells의 NO, PGE₂, IL-1 β , TNF- α 등의 염증매개물질 생성증가를 유의하게 억제함에 대한 보고와 비슷한 경향을 나타내는 것이다. 이와 같이 HC가 LPS에 의해 유발된 대식세포의 NO, KC, IP-10, VEGF, PDGF-BB 생성증가를 유의하게 억제함은 HC가 대식세포의 cytokines 과잉배출로 인한 각종의 염증성질환촉발, 예를 들면 NO와 IP-10의 증가로 인한 퇴행성 뇌신경질환의 진행, PDGF-BB의 증가로 인한 암조직의 혈관신생촉진, KC의 증가로 인한 급성호흡기질환의 악화, VEGF 증가로 인한 자궁내막증식증(endometriosis) 유발촉진 등을 완화할 수 있는 항염효능이 있으며, 그 항염효능은 LPS에 의한 대식세포의 세포내 칼슘 증가를 억제하는 기전이 포함되는 것으로 해석될 수 있다.

이 밖에 LPS에 의한 IL-4, IL-5 등의 cytokines 생성증가에 대해서는 HC가 별다른 유의성을 나타내지 않았다.

이상의 결과, 어성초를 열수 추출하여 제조한 시료 HC는 대식세포의 생존율을 감소시키지 않으면서 LPS로 유발된 대

식세포의 세포내 calcium 증가를 억제하면서, NO, IP-10, PDGF-BB, KC, VEGF의 생성증가를 억제하는 등 유의한 항염효능을 가지고 있는 것으로 나타났다. 앞으로 어성초 물추출물을 이용한 대식세포 관련 염증질환 치료제개발을 위하여 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결론

본 연구에서는 LPS로 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 염증촉발매개물질, 예를 들면 IP-10, PDGF-BB, KC 등의 과잉증가에 대한 어성초(魚腥草) 물추출물(HC)의 작용을 알아보기 위하여 *in vitro* 실험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. HC는 LPS로 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 NO 생성증가를 10 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(P < 0.5).
2. HC는 LPS로 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 IP-10, PDGF-BB, KC, VEGF 생성증가를 50, 100, 200 μ g/mL의 농도에서 유의하게 감소시켰다(P < 0.5).
3. HC는 LPS로 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 세포내 calcium 증가를 25 μ g/mL 이상의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다(P < 0.5).

이와 같은 실험결과를 HC가 대식세포의 NO, IP-10, PDGF-BB, KC, VEGF 생성증가와 관련된 과잉염증반응 및 급만성의 염증질환을 조절할 수 있는 효능을 가지고 있음을 의미한다. 앞으로 HC의 항염효능구명을 위한 보다 세밀한 연구가 요구되어지는 바이다.

References

1. Chunkukhaniguadaehak Gongdonggyoujaepyouchanwewonhoi, Bonchohak, Seoul : Younglimsa, 1991 : 270-1.
2. Gansoshineihakwon, Chinese Meteria Medica, Hongkong : Shanghaigisulchulpansa, 1978 : 1439-41.
3. Na G, Sa MJ, Chungjiipmyoungwibyulrokjeonmoon (Vol. 1), Daijoong : Joonggukwiyakhakwonyoung, 1976 : 297.
4. Dae SM, Junggukyakjaehak(ha), Daibeil : Upsuoguk, 1981 : 1058-9.
5. Ahn DG, Wonsaekhangukbonchodogam, Seoul : Kyohaksa, 1998 : 98.
6. Jeong BS, Shin MK, Dohaehyangyak(saengyak) daesajeun(sikmulpyun), Seoul : Younglimsa, 1990 : 812-3.
7. Sanghaijoonguihakwon, Joongchoyakhak, Shanghai

- : Sangmuinseguan, 1975 : 150-1.
8. Ryu CA, Paeng MP. Hanganjoongchoyakdaesajeun. Hobuk : Jobukguahakkisulchulpansa, 1994 : 665-59.
 9. An JH(as editor). Joongyakhak. Beijing : Inminwisangchulpansa, 1995 : 183-5.
 10. Choi SD(as editor). Joongyakdaejeon. Habei : Heukroynggangguahakkisuchulpansa, 1989 : 301-2.
 11. Shin MK. Imsangbonchohak. Seoul : Younglimsa, 1997 : 574-5.
 12. Park WS. Effect of White Ginseng-Ejung-tang Water Extract on Cytokine Production in LPS-induced RAW 264.7 Mouse Macrophages. Kor J Ori Med Physiol Pathol, 2012 ; 27(6) : 738-44.
 13. Lee JY, Kim YJ, Park WS. Effects of White Ginseng-Ejung-tang Acupuncture Solution on Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Production in LPS-induced Mouse Macrophages. Kor J Acu, 2011 ; 28(1) : 61-9.
 14. Park WS. Effect of Sacchromyces cerevisiae-Fermented Artemisiae Argi Folium on Nitric oxide Production of Macrophage Treated with Toxicants. Kor J Ori Med Physiol Pathol, 2009 ; 23(4) : 883-7.
 15. Park WS. The Effect of Bacillus-Fermented Scutellariae Radix Acupuncture Solution on Interleukin Production in Mouse Macrophage Stimulated by Lipopolysaccharide. Kor J Acu, 2010 ; 27(2) : 95-105.
 16. Park WS. Inhibitory Effect of Gallic acid on Production of Chemokine and Growth Factor in Mouse Macrophage Stimulated by Lipopolysaccharide. Kor J Ori Med Physiol Pathol, 2010 ; 24(4) : 586-91.
 17. Lee JY, Park W. Anti-Inflammatory Effect of Myristicin on RAW 264,7 Macrophages Stimulated with Polyinosinic-Polycytidylic Acid. Molecules, 2011 ; 16(8) : 7132-42.
 18. Lee JY, Park W, Yi DK. Immunostimulatory effects of gold nanorod and silica-coated gold nanorod on RAW 264.7 mouse macrophages. Toxicol Lett, 2012 ; 209(1) : 51-7.
 19. Jeong HR, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong CH, Heo HJ. Antioxidant and Neuronal Cell Protective Effects of an Extract of *Houttuynia cordata* Thunb (a Culinary Herb). Korean J Food Preserv, 2010 ; 17(5) : 720-6.
 20. Jeong BC, Kim DC, Baek SH, Kim EH. The effect of *Houttuynia cordata* thunberg on the inhibition of growth of leiomyomas and apoptosis. J Kor Obstet Gynecol, 2007 ; 20(3) : 1-12.
 21. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. Pharmacol Rev, 1998 ; 50 : 515-96.
 22. Zhang Y, Xu CB, Cardell LO. Long-term exposure to IL-1beta enhances Toll-IL-1 receptor-mediated inflammatory signaling in murine airway hyperresponsiveness. Eur Cytokine Netw, 2009 ; 20 : 148-56.
 23. Long MJ, Tucci MA, Benghuzzi HA. Human gingival fibroblast cell response to gox/cat. Biomed Sci Instrum, 2012 ; 48 : 268-74.
 24. 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 : 286-90.
 25. Kim HS. Isolation from *Houttuynia Cordata* and their anti-inflammatory activity. Graduate School of Joongbu University, 2010 : 75-81.
 26. Lee JY, Lee YJ, Park WS. Anti-inflammatory Effects of Fermented *Houttuyniae* Herba Water Extract on LPS-induced Mouse Macrophage. Kor J Herbology, 2010 ; 25 : 27-34.