

2009년 2월
석사학위논문

산마늘 열수추출물이 LPS로
유도된 RAW 264.7 cell lines에서의
IL-1 β 및 IL-6생성에 미치는 영향

조선대학교 보건대학원

대체의학과

문 환 식

산마늘 열수추출물이 LPS로
유도된 RAW 264.7 cell lines
에서의 IL-1 β 및 IL-6생성에
미치는 영향

The effects of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* hot water
extract on IL-1 β and IL-6 Production
in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cell lines

2009 년 2 월

조선대학교 보건대학원

대 체 의 학 과

문 환 식

산마늘 열수추출물이 LPS로
유도된 RAW 264.7 cell lines
에서의 IL-1 β 및 IL-6생성에
미치는 영향

지도교수 문 경 래

이 논문을 대체의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2008 년 10 월

조선대학교 보건대학원

대체 의 학 과

문 환 식

문환식의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 서재홍 인

위원 조선대학교 교수 박상학 인

위원 조선대학교 교수 문경래 인

2008 년 11 월

조선대학교 보건대학원

목 차

목차	i
<i>List of Tables</i>	iii
<i>List of Figures</i>	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	
A. 연구의 배경	1
B. 연구의 필요성 및 목적	5
C. 관련 문헌 및 연구에 대한 고찰	5
D. 약어정리	6
II. 실험 재료 및 방법	
A. 실험 재료	7
B. 실험 방법	9
III. 실험 결과	
A. 세포 생존률 결과	12
B. IL-1 β 실험 결과	13
C. IL-6 실험 결과	15

IV. 논의 및 제언	17
V. 요약 및 결론	19
참 고 문 헌	20

List of Tables

<Table 1 > Abbreviations	6
<Table 2. > Numerical results of <i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i> on the cell lines viability of RAW 264.7 cell lines	12
<Table 3.> Numerical results of <i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i> on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cell lines	14
<Table 4.> Numerical results of <i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i> on the production of IL-6 in RAW 264.7 cell lines.	15

List of Figures

<Fig.1.> Photo of <i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i>	2
<Fig.2.> The effects of <i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i> on the cell lines viability of RAW 264.7 cell lines	13
<Fig.3.> The effects of <i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i> on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cell lines.....	14
<Fig.4.> The effects of <i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i> on the production of IL-6 in RAW 264.7 cell lines.....	16

ABSTRACT

The effects of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* hot water extract on IL-1 β and IL-6 Production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cell lines

Moon, Hwan-Sig

Advisor: Prof. Moon, Kyung Rye M.D., Ph.D.

Department of Alternative Medicine,

Graduate School of Health Science

Chosun University

The immunomodulatory effect of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* based on the production of inflammatory cytokines and the activation of macrophages was evaluated. The present study was designed to suggest the effects of hot water extract from *Allium victorialis* var. *platyphyllum* on the production of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cell lines. We evaluated on lipopolysaccharide (LPS) induced release of interleukin (IL)-1 β and IL-6 by peritoneal macrophages RAW 264.7 cell lines. The results showed that the water extract from *Allium victorialis* var. *platyphyllum* induced the generation of IL-1 β and IL-6 on LPS-stimulated RAW 264.7 cell lines in a concentration-dependent manner. In addition, the dose of 1.0 and 5.0 mg/ml of hot water extracts showed a significant cytotoxicity, whereas the dose of 0.0057-0.57 mg/ml induced the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6.

I. 서론

A. 연구 배경

식생활 수준의 향상과 복잡한 사회 생활에 따른 스트레스는 각종 질환, 특히 성인병이나 여러 가지 피부질환을 가져오게 되었다. 그러나 현대의 의학 수준에서는 모든 질병을 제거 하지 못하므로 식생활을 개선하여 예방토록 권장 하고 있고 그중 산채의 경우, 지금 까지는 경험적으로 전통식품의 소재로 단순히 이용되어져 왔으나 이들의 생리 활성 기능이 밝혀지면서 유용 산채류 및 채소와 향신료등은 몇가지 질병을 예방하는 것으로 나타나 식습관과 질병의 발병간의 밀접한 관계를 보여준다. 식물은 우리 인간에게 건강을 유지 시켜 주기도 하고 질병을 유발하는 원인이 되기도 한다. 최근에는 질병 조절식품 및 원료 기능성 성분이 영양과 임상적인 연구에 관심을 끌고 있다.

그중에서도 마늘은 수세기 동안 신비로운 치료제로 생각되어져 왔다. 마늘은 인간의 건강에 이익을 줄수 있는 복합적인 구성 성분을 가진 식품으로 여겨진다. 우리나라에서는 옛날부터 강장과 강정식품으로 널리 이용해 왔고 모든 음식의 조리에서 필수적인 양념으로 쓰인다. 마늘을 식용으로 이용하게 된 것은 마늘에 있는 함황아미노산의 일종인 alliin이 분해되면서 마늘 특유의 자극성 신미성분을 생성하기 때문인 것으로 알려져 있다.(Park MH, 1998)

산마늘(*Allium victorialis* var. *platyphyllum*)은 백합과(Liliaceae)에 속하며 아세아의 중부, 아메리카, 히말라야의 산지에 자생하는 다년생 초본식물이다.. 우리나라에서는 울릉도,지리산,설악산 등에 자생하고 있는데(이창복, 1984) 예부터 인경을 구황 식물로 이용하여 연명하였으므로 이를 명이(맹이,맹이)라고 불러 왔으며(이우승 외, 1986) 파나 양파와 비슷한 맛을 지니고 있어 오래 전부터 식용으로 이용되어 왔다.(김태균 외, 2000)

산마늘(*Allium victorialis* var. *platyphyllum*)은 독특한 향이 있어 입맛을 자극하고 무기성분, 비타민 등이 풍부하여 우수한 식품으로 평가 받고 있으며 건강식품으로 인기가 상승하고 있어 수요가 늘어날 전망이다.(이경국 외, 2000). 산마늘은 인경이 있어

길이는 4~7cm, 구직경은 1.5~2cm 정도된다. 잎은 2~3개로 길이가 20~30 cm 폭 10cm로 긴 타원형이다. 잎 아래 부위는 꽃대를 엽초로 싸고 있다(이경국 외, 2000). 산마늘 재배는 해발 600~800m 지대가 생초가 적지 (강치훈 외, 1995)이며, 연화재배 왕겨 7cm 피복처리가 중수효과가 (방순배 외, 1997)산마늘은 표령별로 1년차에는 1엽만 출현하고, 2년 차부터 엽수와 경수가 증가하여 3년차부터 초장, 엽면적 및 주중이 급증하는 경향을 나타내어 3년차부터 수확하는 형태를 띤다.(고재영 외, 2003) 또한 울릉도와 오대산에서 자생하는 2가지 식물 형태가 있는데, 그중 울릉도 산마늘은 생육이 왕성하다. (최병권 외, 1997)

산마늘의 조사 연구는 보통 황함유화합물에 관계되어 있고 아마 산마늘 속에 높은 함량으로 존재하는 것과 여러 가지 황함유화합물에 기여하는 약학적 활성 때문인 것이다. 산마늘은 식물분류학적으로나 생약학적 용도면에서 마늘과 상당히 유사함에도 불구하고 그 식물의 형태가 현저히 다른 것이 특이하다.(Lim,sc외, 1996) 최근 산마늘의 생약학적 용도면에서 가치를 인정받고 산나물로서의 중요성이 인식되고 있으나 산마늘에 관한 연구는 아직 초기 단계이다.

산마늘의 모습을 아래 <Fig.1.>에서 보이고 있다.



<Fig.1.> Photo of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*

따라서 본문에서는 백합과의 Allium속 식물의 산마늘이 여러 가지 용도로 쓰이는 식습관을 고려하여 다양한 생리적 기능을 함유하고 있는 산마늘의 RAW 264.7 cell에서의 IL-1 β 및 IL-6에 미치는 영향에 관한 연구를 하고자 하였다.

면역계(Immune System)는 감염 (바이러스, 기생충, 미생물 등)이나 자가면역질환 (hypersensitivity, 암, 알레르기 등)으로부터 생체를 보호한다. 면역계는 백혈구, T-, B-림프구, 거식세포들이 서로 밀접한 관계를 유지하면서 조절되며 이 과정에서 많은 cytokines들이 작용한다. 또한 대식세포는 외부에서 유입된 물질을 가장 처음 접하여 비특이적 식작용 및 세포 흡수작용, Fc수용체 및 보체수용체에 의해서 중개되는 opsonin작용을 받은 미생물에 대한 특이적 식작용, 섭취된 미생물의 살해, T 및 B 림프구에 대한 항체 출현, lysozyme, collagenase, elastase, acid hydrolase 등의 많은 효소, 및 각종 T, B cell의 활성화와 관계된 cytokine의 분비를 통해 면역 및 염증반응의 시발점으로 작용하는 중요한 세포이다(Oshima,H외.1994) (Kroncke KD외.1998) Cytokine은 각종 생리학적, 병리학적 과정에 관여하며 특히 면역반응, 염증, tissue remodelling, 그리고 배발생 과정에 중요한 역할을 담당하고 있다(Lee 외.2000). 이들 cytokine 중에서 특히 감염이나 조직상해 등에 대한 숙주방어에 깊이 관련이 되어있는 것으로는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등이 있다.(Feldmann,M외.1996) (Harada,A외. 1994) 이들 cytokine들은 특히, 체내에서 endogenous pyrogen으로 작용하여 염증성 cytokine으로도 불려지고 있다. 본 실험에서는 대식세포주는 RAW 264.7세포를 이용하여 실험에 사용하였다.

대식세포는 단핵 대식세포계(monocyte phagocyte system)의 일부로서 조혈모세포에서 기원한다. 이 세포는 감염체를 포함한 각종 입자를 탐식하며 이를 세포내로 취하여 파괴한다(대한병리학회, 2005).

대식세포는 외부에서 유입된 물질을 가장 처음 접하여 비특이적 식작용 및 세포 흡수작용, Fc수용체 및 보체수용체에 의해서 중개되는 opsonin작용을 받은 미생물에 대한 특이적 식작용, 섭취된 미생물의 살해, T 및 B 림프구에 대한 항체 출현, lysozyme, collagenase, elastase, acid hydrolase 등의 많은 효소, 및 각종 T, Bcell의 활성화와 관계된 cytokine의 분비를 통해 면역 및 염증반응의 시발점으로 작용하는 중요한 세포이다. 이 세포 중 가장 잘 알려져 있으며, 널리 사용되고, 많은 실험을 통해 그 기능 및 실용성이 증명되어 있는 마우스 단핵구 기원인 Raw 264.7 세포를 사용하여 실험 하였다.

Cytokine이란 면역 반응이 적절하게 일어나기 위해서는 여러 면역세포들의 직접적인 또는 간접적인 상호작용이 있어야 한다. 면역세포의 상호작용에는 한 세포 표면에 있는 수용체와 다른 세포 표면에 있는 수용체간의 직접적으로 결합을 통한 세포간의 연락 (통화, communication)이 중요한 수단이 되고 있다. 이런 경우 이외에 단백질의 분비에 의해서 이루어 지는 경우도 있다. 이들 단백질들은 어떤 세포에 의해 만들어져, 그 세포 밖으로 분비되며, 다시 자신이나 이웃한 세포 또는 먼 곳에 있는 세포에 작용한다. 이런 단백질들은 세포의 분화나 증식에 관여한다. 기능의 활성화와 변화를 유도하기 때문에 Cytokine 이라고 하는 것이다.

Cytokine은 여러 가지 면역세포들에 의하여 만들어지며, 여러 가지 면역세포의 활성화 (activation), 성장 (growth), 분화 (differentiation)등에 영향을 미칠 수 있다. Cytokine단백질들은 자연면역과 획득면역 반응에 관여할 뿐 아니라, 면역세포의 성숙과정에서도 중요한 작용을 나타낸다.

Cytokine은 하나의 세포에서 만들어 지는 것이 아니고, 여러 가지 세포에서 만들어진다. 그리고 상황에 따라서 여러 가지 Cytokine을 만들 수 있다. 사이토카인의 작용도 한 가지 작용만을 하는 것이 아니고, 여러 가지 기능을 유도할 수 있다. 또 Cytokine끼리 작용을 하면 그 작용의 효과가 상승을 할 수도 있고 (상승작용, synergy), 반대로 그 효과가 상쇄되는 경우도 있다 (길항작용, antagonism). 결과적으로 다양한 Cytokine의 연쇄반응을 유도할 수도 있다 (cascade induction). Cytokine의 작용은 그 생성 원인이 사라지면 같이 사라지게 된다.

Cytokine은 각종 생리학적, 병리학적 과정에 관여하며 특히 면역반응, 염증, tissue remodelling 및 배 발생 과정에 중요한 역할을 담당하고 있다. 이들 cytokine 중에서 특히 감염이나 조직상해 등에 대한 숙주방어에 깊이 관련이 되어있는 것으로 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 등은 활성화된 대식세포에서 분비된다.(Goldring,C.E.외,1995). 이들 cytokine들은 체내에서 endogenous pyrogen으로 작용하여 염증성 cytokine으로도 불려진다.

본 실험에서는 대식세포주인 마우스 단핵구 기원인 RAW 264.7세포를 이용하였고, Cytokine IL-1 β , IL-6를 실험에 사용 하였다.

B .연구의 필요성 및 목적

본 연구는 우리나라 울릉도,지리산,설악산 등에 자생하고 있는 산마늘이 사이토카인의 일종인 IL-1 β , IL-6에 어떤 변화를 주는가를 밝히는 기초 연구의 일환이다.

배양된 RAW 264.7 cell line에 산마늘 열수 추출물과 LPS를 처리한후 세포의 상등액(Supernatant)을 회수하여 ELISA Kit로 IL-1 β , IL-6를 측정하여 활성화된 대식세포(RAW 264.7 cell)에서 산마늘 열수추출물의 영향을 살펴보고자 하였다.

C. 관련 문헌 및 연구에 대한 고찰

국내 산마늘의 추출물에 대한 연구가 학술지 및 학위 논문으로 이루어진 바가 있다. 먼저 산마늘에 관한 국내 연구는 오래 전부터 조금씩 이루어져 왔으며 최근들어 산마늘의 생약학적 용도면에서 가치와 산나물로서의 중요성이 인식되어 그 생리적 유용성이나 효과에 대해서는 몇몇 논문들을 통해 밝혀지고 있다.

산마늘 추출물을 주성분으로 하여 벌꿀과 과당을 첨가하여 건강 음료 연구를 하였다.(Nishimura,H.K, 1971) 그리고 기능성물질 분석 생육환경과 영양평가(Choi, S.T.1993), 콜레스테롤 저하 활성 및 항동맥경화 효과(Lee, S.S, 2004),(Kim, Y.G, 2000), 간보호 및 항당뇨 효과 등에 대한 연구가 보고 되고있다.(Choi, J.W, 2003)

산마늘의 생리적 유용성을 알아보하고자 한 연구에서는 STZ으로 당뇨를 유발한 흰쥐에 산마늘 추출물을 경구 투여하였을때 당뇨병 증세가 억제되었다는 결과를 확인 하였다.(최종원 외, 2003)

Allium속의 함황화합물은 효소적 반응과 발열반응을 통해 건강증진에 기여 한다고 하는데 allicin으로부터 열화학적으로 전환된 allyl trisulfides, dithiins 및 ajoene 같은 항혈전 물질이 산마늘에서 확인 되었다.

산마늘의 중요한 향기 성분은 methyl allyl disulfide, diallyl disulfide, dimethyl disulfide 및methyl allyl trisulfide이다.

산마늘의 dichloromethane 추출물에서 2-vinyl-4H-1,3-dithiin 및 3,4-dihydro-3-vinyl-1,2-dithiin 같은 혈소판 응집 저해제가 검출되어 중요한 건강증진제인 allyl trisulfide와 dithiin은 산마늘을 frying pan에서 조리할 때 상대적으로 증가된다고 확인하였다.(Nishimura,H. 외.2000) 또한 산마늘의 2-vinyl-4H-1,3-dithiin은 암세포를 파괴하며(Lee KT. 2001), 산마늘 추출물이 식이성 고지혈 및 비만에 효과에 대한 논문이 있었는데 산마늘 추출물은 혈청 triglycerid, total cholesterol 및 LDL-cholesterol의 농도를 감소시키는 효과를 보였으며 산마늘이 비만억제 효과가 있는 것으로 보고 했다 (최종원,외. 2005)

D. 약어 정리

본 연구에서 사용되는 약어를 정리하면 <Table 1.> 과 같다.

<Table 1.> Abbreviations

Abbreviations	Full names
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl-sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IL-1 beta	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
LPS	Lipopolysaccharide
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium
Tween20	polysorbate 20
PBS	phosphate buffered saline

II. 실험의 방법 및 내용

A. 실험 재료

1. 재료의 채취 및 보관

2008년 5월 하순경에 울릉도 나리분지 일대에서 자생하는 산마늘 진초를 채취하여 -20℃ 냉동 보관하면서 필요시마다 사용하였다.

2. 시약

LPS (lipopolysaccharide, Escherichia coli 026:B6)는 Sigma(st.louis, MO USA)에서 구입하였고, Fatal bovine serum(FBS)와 antibiotics는 Gibco/BRL(Eggnestein, Germany)로부터 구입하였으며, IL-1 beta, IL-6 ELISA kit는 BD bioscience(USA)사에서 구입하였다.

3. 시약제조 방법

Coating buffer- 7.13g의 NaHCO_3 1.59g Na_2CO_3 를 1L 메스실린더에 넣고 멸균 증류수를 가했다. pH를 10N 수산화나트륨을 이용하여 9.5로 조정한다. 1L 눈금까지 증류수를 채워 1L 용액으로 하여 사용하였다.

PBS-phosphate buffered saline 80g NaCl , 11.6g Na_2HPO_4 , 2.0g KH_2PO_4 , 2.0 KCl 을 증류수 10리터에 가하고 pH를 7.0으로 조정하여 사용하였다. Wash buffer-phosphate buffered saline에 0.05%가 되도록 Tween 20을 넣어 사용하였다..

O-phenylene diamine이 첨가된 기질 용액- O-phenylene diamine을 시그마에서 구입하여 증류수에 녹인 후 (50mg/mL)에 0.1mL씩 나누어서 -20℃ 냉동고에 보관하며 사용하였다. 사용시 용액을 녹인 후 0.1mL을 10mL의 citrate buffer와 10uL의 과산화수소에 희석하여 사용하였다. Citrate buffer-2배 진하게 조제한 후 사용시 희석하여 사용하였다. 3.09g citric acid와 10.38g의 sodium citrate를 적절한 양의 증류수에 녹

인 후 pH 5가 되도록 했고 최종부피가 500mL이 되도록 증류수로 맞춘 후 50mL씩 나누어서 -20도 냉동실에 보관하며 사용하였다. 사용전에 증류수로 2배 희석하여 사용하였다. Blocking buffer- phosphate buffered saline에 Fetal bovine serum(FBS)가 10%가 되도록 첨가하여 사용하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)- MTT과 우더를 phosphate buffered saline에 녹여 최종농도가 약 5mg/mL이 되도록 하여 1mL씩 분주하여 -20°C의 냉동실에 보관하며 사용하였다. 사용전에 원하는 농도로 적절하게 해당 배지나 phosphate buffered saline으로 희석하여 사용하였다.

4. 대식세포 배양

Mouse peritoneal macrophage cell line인 RAW 264.7 dms (사)한국 세포주은행으로부터 분양받았다. RAW 264.7은 10% Fatal bovine serum(FBS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA),과 penicilline 100U/mL과 streptomycin 100ug/mL의 항생제를 포함하는 DMEM배지를 사용하여 실험실에서 37°C, 5% CO₂ 공급 조건을 갖춘 동물세포 배양기에서 계대배양하며 사용하였다.

5. 시료추출

습중량으로써 시료 25g을 정확하게 달아, 잘게 분쇄하고 멸균증류수 100ml를 가하여 95°C에서 중탕으로 5시간동안 추출하였다. 추출액은 여과지를 이용하여 잔여불순물을 제거 하여 50°C, 진공하에서 향량이 될 때까지 건조하였다. 건조한 추출물은 일정량 소분하여 -20°C에서 냉동상태로 보관하고 매 실험할 때마다 멸균 및 마이크로 필터(pore size 0.45um)로 제공된 멸균증류수에 녹여 사용하였다.

B. 실험 방법

1. 세포생존률

Cytokine에 의하여 생성되는 nitrite가 RAW 264.7 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT방법을 실시하였다. 이 방법은 세포의 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)가 formazan으로 전환되는데 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 먼저, RAW 264.7 세포 1×10^5 cell/mL를 24 well plate에 1mL분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에 산마늘 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후, phosphate buffered saline(PBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 녹인 5 mg/mL의 MTT(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)용액 50 µL를 각 well에 넣고 37°C, 5% CO₂배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide에 formazin을 용해한 후, microplate reader(Model 550, Bio-Rad laboratories, Japan)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포생존율 측정은 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 10^4 cells/well로 분주한 다음 애기땅빈대를 농도별로 처리하여 구하였다. 세포에 0.01-5mg/mL의 농도로 37°C, 5% CO₂하에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT(0.5mg/mL)를 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals를 DMSO에 녹여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$viability(\% control) = 100 \times \frac{absorbance\ of\ treated\ sample}{absorbance\ of\ control}$$

2. 대식세포활성

RAW 264.7 cell을 24well plate에서 7.5×10^4 cell/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양하여 세포를 적응시켰다. (37°C, 5% CO₂ .) 배양 후 각 well에 투입된 시료의

최종농도는 산마늘은 최종농도가 5.7, 1.14, 0.57, 0.114, 0.057, 0.0114, 0.0057 mg/mL 이 되도록 처리하였다. LPS는 최종농도가 0.5 ug/mL가 되도록 처리하였으며 추출물과 LPS는 동시에 처리하고 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 cytokine분석을 위한 시료로 사용하였다. 수거한 시료는 측정 전까지 -70℃에서 냉동 보관하였다. IL-1 beta, IL-6은 ELISA kit(BD bioscience)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 Manufacturer's protocol에 따랐다.

3. ELISA 방법에 의한 IL-1 β , IL-6의 생성량 측정

RAW 264.7 cell line을 24 well plate에서 7.5×10^4 cell/well이 되도록 분주하여 24시간동안 배양하여 세포를 적응시켰다. (37°C, 5% CO₂ .) 배양 후 각 well에 산마늘 추출액 시료를 최종농도가 5.7, 1.14, 0.57, 0.114, 0.057, 0.0114, 0.0057 mg/mL이 되도록 처리하였다. LPS는 최종농도가 0.5ug/mL가 되도록 처리하였으며 추출물과 LPS는 동시에 처리하고 24시간 배양한 후 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액은 IL-1 β , interleukin(IL)-6, 양을 측정하는데 사용하였다.

plate-bottomed microwell plate(96 well)에 항체(1차항체)를 coating buffer(0.1 M NaHCO₃, pH 8.2)를 이용하여 희석한 다음 각 well에 100uL씩 넣어 4℃에서 overnight incubation 하여 well plate바닥에 항체를 고정시켰다. 이어서 투입한 coating buiffer를 제거하고 well plate를 washing buffer(0.05% tween 20이 포함된 PBS)를 3회 투입하여 well plate를 세척하였다. 세척 후 0.1% BSA(bovine serum albumine) 용액을 100uL를 넣어 2시간동안 상온에서 반응시켜 항체를 제외한 well plate에 BSA를 결합시켜 다른 이물이 plate바닥에 붙지 않도록 blocking하였다. blocking 후 다시 washing buffer(0.05% tween 20이 포함된 PBS)를 3회 투입하여 well plate를 세척하였다.

세척 후 실험에서 채취한 배양 상층액 및 표준용액을 적당한 비율로 희석하여 plate에 각각 100uL 넣고, 실온에서 2시간 incubation시켰다.

이어 시료를 제거하고 반복하여 washing buffer(0.05% tween 20이 포함된 PBS)를 5회 투입하여 well plate를 세척하였다.

세척이 끝난 다음, biotin 과 결합한 2차 항체용액을 100 μ l 첨가하여 실온에서 1시간정도 반응을 시켰다. 반응 후 다시 2차 항체 용액을 제거하고 washing buffer(0.05% tween 20이 포함된 PBS)를 5회 투입하여 well plate를 세척하였다. Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 100 μ l를 넣어 실온에서 1시간 incubation시키고 Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate용액을 다시 제거하고 마지막으로 washing buffer(0.05% tween 20이 포함된 PBS)를 7회 투입하여 well plate를 세척하였다. 세척 후 기질로 O-phenylene diamine이 첨가된 기질 용액 100 μ l를 넣은 후 발색시킨 다음, 약 30분간 상온에서 반응하고 반응액에 2N-H₂SO₄ 50 μ l를 넣어 총 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 후 micro plate reader(Model 550, Bio-Rad laboratories, Japan) micro plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cytokine의 농도는 표준곡선을 이용하여 환산하였고 각 Cytokine의 측정한계치는 10 ng/ml이었다.

실험은 3번이상 실행하여 결과를 평균값 \pm 표준편차로 표현하였다.

III. 실험 결과

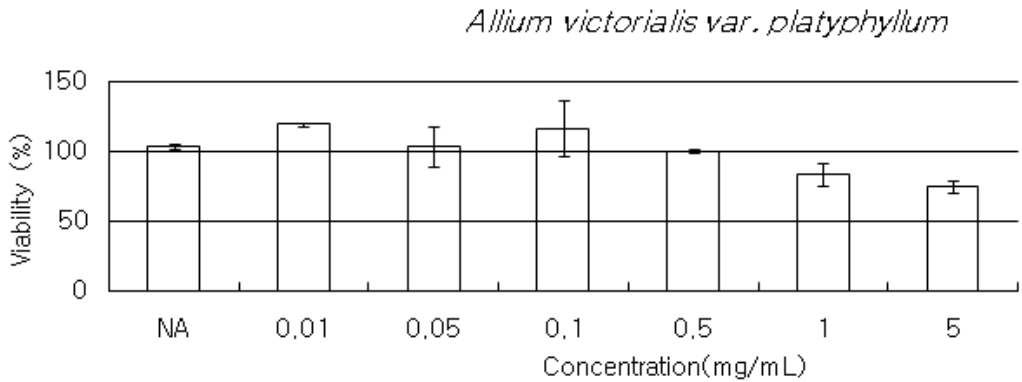
A. 세포 생존률

세포생존을 측정은 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 10^4 cells/well로 분주한 다음 산마늘을 농도별로 처리하여 구하였다. 세포에 0.01-5 mg/mL의 농도로 37°C, 5% CO₂하에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (0.5mg/mL)시약을 4시간 처리한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals를 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였을때 결과를 <Table 2.>, <Fig 2.>와 같이 표현 하였다.

<Table 2.> Numerical results of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* on the cell line viability of RAW 264.7 cell lines

	<i>Concentration</i>	<i>Average</i>	<i>Std. Dev.</i>
NA		103.0585	2.048924
<i>Allium victorialis</i> var <i>platyphyllum</i> (산마늘)	0.01 mg/ml	118.80	1.64
	0.05 mg/ml	103.16	13.93
	0.1 mg/ml	116.10	19.67
	0.5 mg/ml	99.97	1.78
	1 mg/ml	83.26	8.47
	5 mg/ml	74.19	4.37

산마늘 열수추출물을 0.01-5 mg/mL 의 농도범위에서 RAW 264.7 cell에 처리했을 때 0.5 mg/mL이하에서 세포독성이 나타나지 않았으며, 1 mg/mL, 5 mg/mL의 시료 농도에서는 세포독성이 유의적으로 나타남이 드러났다.



<Fig 2.> The effects of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* on the cell lines viability of RAW 264.7 cell lines.

RAW 264.7 cell lines were cultured in DMEM containing 10% FBS. Each well of a 24 well plate was seeded with 5 X 10⁴ cell lines. Then incubated with *Euphorbia supina* Rafin . After 2 days incubation, the cell lines were reacted with MTT for counting cell lines proliferation levels. The assay was performed in triplicate

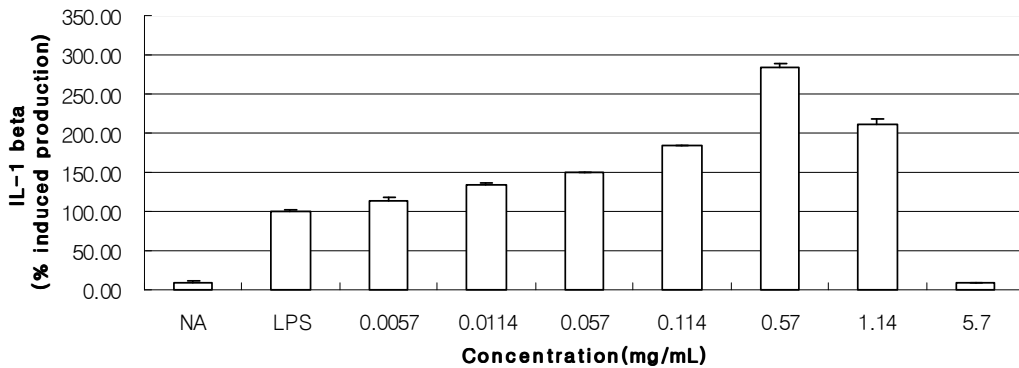
B. IL-1 beta 실험 결과

배양된 RAW 264.7 cell에 LPS처리시 사이토 카인 IL-1 beta 분비량을 100%로 했을 때 시료의 농도가 0.057mg/ml 일때 LPS에 비해 149.00%(0.32%오차)의 IL-1beta의 증가를 보였으며, 산마늘 열수 추출물 시료의 농도가 0.57 mg/ml 일때 LPS에 비해

284.34%(5.30%의 오차)의 증가를 보였다.

<Table 3.> Numerical results of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cell lines.

	Average	Std. Dev.
NA	10.21	0.99
LPS	100.00	1.65
0.0057 mg/ml	114.29	3.32
0.0114 mg/ml	134.21	2.01
0.057 mg/ml	149.00	0.32
0.114 mg/ml	184.62	0.19
0.57 mg/ml	284.34	5.30
1.14 mg/ml	211.30	7.52
5.7 mg/ml	8.37	1.31



<Fig.3.> The effects of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cell lines.

production of IL-1 β was measured in the medium of RAW 264.7 cell lines cultured with LPS(1 μ g/ml) in the presence or absence of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* for 24 h. The amount of IL-1 β was measured by immunoassays as described in section 2. Data represent the mean \pm S.D with three separate experiments.

산마늘 열수 추출물 시료의 농도가 0.0057 mg/ml 에서 0.57 mg/ml 까지 사이토 카인 IL-1 β 분비량이 유의적으로 증가 하였으며, 이후의 농도에서는 세포 독성으로 인 하여 세포가 사멸하여 사이토카인 IL-1 beta 분비량이 줄어 드는 것으로 나타났다.

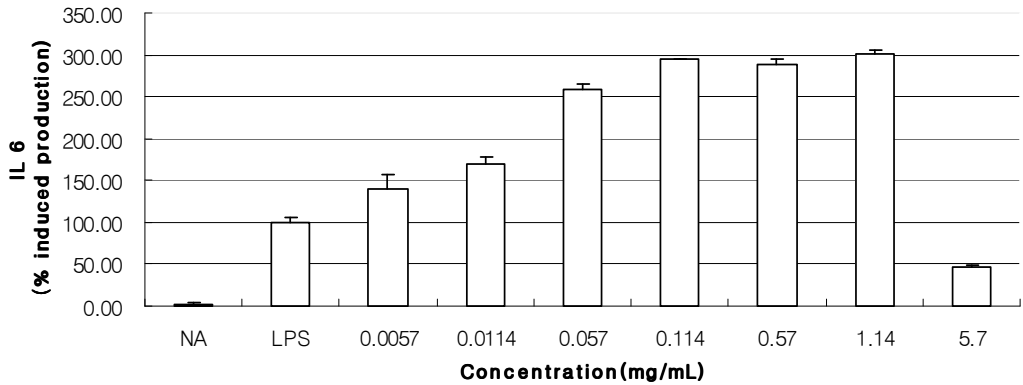
C. IL-6 beta 실험 결과

배양된 Raw 264.7 cell에 LPS처리시 염증성 사이토카인 IL-6 생성량을 100%로 했을때 시료의 농도가 0.014 mg/ml 일때 LPS에 비해 169.19% (9.67%오차)의 IL-6의 생성증가를 보였으며, 산마늘 열수 추출물 시료의 농도가 0.057 mg/ml 일때 LPS에 비해 259.39% (5.43%오차)의 IL-6의 증가를 보였으며, 산마늘 열수추출물 시료의 농도가 0.114 mg/ml 일때 LPS에 비해 294.37%(0.19%의 오차)의 증가를 보였다.

산마늘 열수 추출물 시료의 농도가 0.0057 mg/ml에서 0.114 mg/ml 까지 염증성 사 이토카인 IL-6 분비량이 유의적으로 증가하였다.

<Table 4.>Numerical results of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* on the production of IL-6 in RAW 264.7 cell lines

	Average	Std. Dev.
NA	1.28	2.03
LPS	100.00	6.74
0.0057 mg/ml	140.54	15.94
0.0114 mg/ml	169.19	9.67
0.057 mg/ml	259.39	5.43
0.114 mg/ml	294.37	0.19
0.57 mg/ml	288.05	5.99
1.14 mg/ml	300.95	3.77
5.7 mg/ml	46.90	2.85



<Fig.4.> The effects of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* on the production of IL-6 in RAW 264.7 cell lines.

production of IL-6 was measured in the medium of RAW 264.7 cell lines cultured with LPS(1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$) in the presence or absence of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* for 24 h. The amount of IL-6 was measured by immunoassays as described in section 2. Data represent the mean \pm S.D with three separate experiments.

IV. 논의 및 제언

산마늘(*Allium victorialis* var. *platyphyllum*)을 잎과 인경은 산채 식물로서 뿐만 아니라 민간에서는 전초를 비타민 결핍증에 사용하거나 위장병, 특히, 위염, 신경쇠약, 심장병 등에도 사용하여 왔으며 대체로 마늘과 같은 용도로 쓰인다.(Moon KS, 1984)

산마늘의 잎은 2~3%의 탄수화물과 ascorbic acid를 함유하고 인경은 함유황 유기화합물을 함유한다고 알려져 있다.(Lawson LD, 1991)산마늘에 함유된 함유황 화합물은 S-alkenyl- 혹은 S-alkyl-L-Cysteine의 형태로 존재하고 이 식물이 조직손상을 당하면 alliinase의 활성화에 따라 마늘과 유사한 냄새를 나타내는 disulfided의 휘발성 화합물을 발생 시킨다. 이들 유황화합물은 혈소판응억제활성을 나타낸다는 보고도 있다.(WijayaCH외,1996) (Liakopoulou-Kyriacidesm.외, 1985)

면역계(Immune System)외부로부터의 감염 (바이러스, 기생충, 미생물 등)이나 자가면역질환 (hypersensitivity, 암, 알레르기 등)으로부터 우리생체를 보호한다. 대식세포는 골수에서 생성되어 혈관 내에서는 단구로, 조직 내에서는 대식세포로 존재하며 미생물 감염에 대한 숙주 방어와 항상성 유지의 역할을 한다.

대식세포는 자연면역 뿐 만 아니라 획득면역등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성유지에 관여 하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시 reactive oxygen species(ROS) 와 IL-1 β , TNF-a 및 IL-6 와 같은 Cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다(Lee BG.외,2000)

실험에 나타낸 바와 같이 산마늘 열수 추출물을 농도 의존적으로 첨가하여 배양하였고 음성 대조군으로는 배양액을 첨가하였으며, 양성 대조군으로는 LPS를 첨가하여 시료 처리 후 배양하였다. 그 결과 산마늘 열수 추출물이 시료 무처리 대조군에 비해 약 2배 정도의 IL-1 β , IL-6의 생성을 높이는 것을 확인 할 수 있었다.

실험은 산마늘의 열수 추출물을 RAW 264.7 cell lines에 농도 의존적으로 첨가하여 배양하였고, 음성 대조군으로는 배양액을 첨가하였으며, 양성 대조군으로는 LPS를 첨가하여 시료 처리 후 배양하였다. 배양 후 세포의 상등액(Supernatant)을 회수하여 ELISA Kit로 IL-1 β , IL-6를 측정하여 활성화된 대식세포(RAW 264.7 cell lines)에

서 산마늘의 열수추출물의 영향을 살펴보았다.

이러한 실험의 결과는 산마늘의 열수추출물 농도가 실제로 섭취할 수 있는 저농도의 시료구간에서 유의적인 LPS 유도 IL-1 β , IL-6의 생성 증가 효과를 보였고, 실험적 농도인 1.14 mg/ml 의 시료농도에서 IL-1 β , IL-6의 생성억제 효과를 보였다. 다시 말하자면, 산마늘의 열수추출물 농도가 고농도 일 때는 유의적으로 염증을 억제하는 것으로 나타났고, 저농도 일 때는 이와 상반된 결과를 보였다

본 연구 결과로 미루어, 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6의 생성이 높아져, 항염증 결과를 확인하기는 어려웠으나, 추후 면역성 사이토카인인, IL-2, 4, 10, TGF- β 등의 사이토카인을 정량한다면, 산마늘 면역력 증가의 결과를 확인 할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 천연물 시료의 추출용매에 따라 추출 가능한 활성성분의 차이가 있으므로, 메탄올 추출, 에탄올 추출, 디클로로메탄, 헥산등 다양한 용매를 이용하여 산마늘 추출물을 준비하여 열수 추출에서의 사이토카인과의 양상을 비교해 볼 필요가 있으며, chemical 자극시 세포에서 분비하는 사이토카인의 시간별 분비양상이 다르므로, LPS와 산마늘 시료 처리후 경과 시간에 따른 사이토카인 분비양상을 관찰해볼 필요가 있다. 더 나아가서는 동물실험을 통하여 *in vivo*(동물실험)테스트 상에서 산마늘 추출물이 실험동물에 미치는 영향에 대해 살펴볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

따라서 추후로 *in vivo*(동물실험)테스트를 통하여 직접 시료를 마우스에 경구투여하여 IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 사이트카인을 측정할 필요가 있다.

V. 요약 및 결론

산마늘 열수 추출물을 RAW 264.7 cell line에 농도 의존적으로 첨가하여 배양하였고 Blank으로는 배양액을 첨가하였으며, 자극제 (Stimulator)로는 LPS를 첨가하여 시료 처리 후 24시간 배양하였다. 배양후, 세포의 Supernatant를 harvest하여 ELISA Kit로 IL-1 β , IL-6를 측정하여 활성화된 대식세포 (RAW 264.7 cell)에서 산마늘 열수추출물의 영향을 관찰한 결과, 산마늘 열수 추출물이 시료 무처리 대조군에 비해 0.57 mg/ml의 농도에서 약 2배 정도의 IL-1 β 와 IL-6의 생성량을 높이는 것을 확인하였다.

따라서 사람이 실제로 섭취 할 수 있는 저농도의 시료농도에서는 유의적인 LPS유도 IL-1 β , IL-6의 생성 억제효과를 보이지 않았지만 실험적 농도의 1.14 mg/ml 이상에서는 유의적인 IL-1 β , IL-6의 생성억제 효과를 보였다.

참고문헌

- 강치훈, 최병곤. “산마늘 재배법 확립에 관한 연구” (강원도농업기술원시험연구보1995), p.279-282
- 고재영, 조수현. “산마늘 재배기술 개발시험” (고원농업 시험장 시험 연구 보고서 2003), p. 6.
- 김태균· 김승희· 강석연· 정기경· 최돈하· 박용복· 류중훈· 한형미: “동맥경화유발 토끼와 형질전환 마우스에서 산마늘 추출물의 항동맥경화 효과”, 「생약학회지」, 제31권149-156, 2000.
- 대한병리학회: 「병리학[1](제5판)」, 서울:고문사, 2005, pp.67-98
- 방순배, 모영문, 최병곤 “산마늘, 누룩치의 연화재배법 개발연구” (강원도농업기술원 시험연구보고서 1997), p.728-731
- 이경국, 홍정기, 안명훈, 방순배, 박영학, 권순배, 장광진.:「새소득원 산채류 재배」.:2000, p. 218-227.
- 이우승, 정재동, 홍성천: 「慶北大論文集 41」, 1986, pp. 421-453
- 이창복: 「大韓植物圖鑑」, 서울:鄉文社,(1984).
- 최병곤, 방순배, 권순배. “산마늘 묘령별 특성비교 및 재배법 확립에 관한 연구” (강원도농업기술원 시험연구보고서 1997), p. 734-736\최상태. 이준탁. 박우철:“야생산마늘의 생육 환경과 영양 평가”, 「한국농화학회지」, 제36권, 502-509, 1993.
- 최종원·이경태·김원배 ·박광균 ·정현주 ·박희준 : “Streptozotocin, Poloxamer 407, CCl₄ 및 D-galactosamine으로 유도한 병태모델 흰쥐에 대한 산마늘 추출물의 약리효과”, 「생약학회지」, 제34권 250-255, 2003.
- Choi, J.W., Lee, K.T., Kim, W.B., Park, K.G., Jung, H.J. andPark,HJ.:“Pharmacological effects of the *Allium victorialis* var. *Platyphyllum* extract on the rats induced by streptozotocin, poloxamer-407, CCl₄ and D-Galactosamine”, Kor.J. Pharmacon. 34:149-156, 2003.
- Feldmann, M., Brennam, F.M., and Maini, R. N. : "Role of cytokines in rheumatoid arthritis", *Annu. Rev. Immunol.* 14:397-440, 1996

- Goldring, C. E., Narayanan, R., Lagadec, P., Jeannin, J.F. : "Transcriptional inhibition of the inducible nitric oxide synthase gene by competitive binding of NF-kappa B/Rel proteins", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:73-79, 1995.
- Harda, A., Sekido, N., Akaoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. J. : "Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation", *J. Leukoc. Biol.* 56:559-564, 1994.
- Kroncke KD., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. : "Inducible nitric oxide synthase in human diseases", *Clin. Exp. Immunol.* 113: 147-156, 1998.
- Lawson LD, Wang ZJ, Hughes BG. : " γ -glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* sp. : Precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates", *J Nat prod.* 54:436-444, 1991
- Lee BG., Kim SH., Zee OP., Lee KR., Lee HY., Han JW. : "Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*", *Eur J pharmacol.* 406(3):301-9, 2000
- Lee KT., Choi JH., Kim WB., Kwon SH., Park HJ : "Constituents and the antitumor principle of *Allium victorialis* var *platyphyllum*", *Arch Pharm Res* 24:44-50, 2001
- Liakopoulou-Kyriakides M, Sinakos Z, Kyriakidis DA. : "Identification of alliin, a constituent of *Allium cepa* with effect on platelet aggregation", *phytochem*, 24:600-601, 1985
- Lim, S.C., Park, H.J., Yun, S.Y., Lee M.S., Kim, W.B., and Jung, W.T. : "Structures of flavonoids and furostanol glycosides isolated from the bulbs of *Allium victorialis* L", *J. Kor. Soc. Hort. Sc.* 37:675-679, 1996.
- Moon KS: "Components and use of herbal medicine", Scientific Encyclopedia :Pyongyang, 1984, pp. 671-672.
- Nishimura, H., Takahashi, T., Wijaya, CH., Satoh, A., Ariga, T. : "Thermochemical transformation of sulfur compounds in Japanese domestic *Allium*, *Allium victorialis* L", *Biofactors.* 13: 257-263, 2000
- Oshima H., Bartsch H. : "Chronic infections and inflammatory processes as cancer

- risk factors: possible role of nitric oxide in car-cinogeneis", *Mutat. Res.* 305: 253-264, 1994.
- Park, H.J., Kim, W.B., Yoo, K.O. and Jung, W.T. : "Chemical analysis on biological active substances among habitats of *Allium victorialis* for a high income crop", *Kor. J. Plant. Res.* 11:51-60, 1998.
- Park, MH., Kim, JP., Kwon, DJ. : "Physico-chemical characteristics of components and their effect of freezing point depression of garlic bulbs..", *korean J Food Sci Technol*, 20: 205-212, 1988.
- shirataki Y, Motohashi N, Tani s, Sunaga K, Sakagami H, Satoh K, Nakashima H, Kanamoto T, Wolfard K, Monal J. : "Antioxidative activity of *Allium victorialis* L. extracts", *Anticancer Res.* 21: 3331- 3339, 2001
- Wijaya CH., Muchtani D., Lalel HJ., Zakria F., Kowara S. : " Antiplatelet aggrgation potencies of some *Allium* sp. grown in indonesia", *Nat Prod Sci*, 2:37-42, 1996

저작물 이용 허락서

학 과	대체의학과	학 번	20078637	과 정	석사
성 명	한글: 문환식	한문: 文 煥 植	영문: Moon, Hwan-Sig		
주 소	광주광역시 서구 치평동 해광한신@102동 1308				
연락처	Email: paradais170@hanmail.net				
논문제목	한글: 산마늘 열수추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell lines 에서의 IL-1 β 및 IL-6 생성에 미치는 영향				
	영문: The effects of <i>Allium victorialis</i> var. <i>platyphyllum</i> hot water extract on IL-1 β and IL-6 Production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cell lines				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB 구축과 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장체에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경을 금지함.
3. 배포, 전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등을 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간 종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판 허락을 하였을 경우 1개월 이내에 소속 대학에 통보함
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대()

2009년 02월 일

저작자 : 문 환 식 (인)

조 선 대 학 교 총 장 귀 하

