

# 絲瓜絡의 항산화효과 및 3T3-L1분화 시 Cytokine류에 미치는 영향

윤용관 · 차윤엽\*

상지대학교 한의과대학 한방재활의학과학교실

## Experimental Study on Antioxidative Effect of Luffae Fructus Retinervus and Their Effects on Cytokines to 3T3-L1 Cell Lines

Yong Kwan Yoon, Yun Yeop Cha\*

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Sangji University

In recent year, We are concerned in anti-aging, disease-protection, long-life, many method are used in solving this problem. Recently, We heard that Luffae Fructus Retinervus(LFR) has effect of anti-aging, disease-protection, long-life. So I let made a experiment for this result. The purpose of this study is to; 1) the anti-oxidant effect of Luffae Fructus Retinervus(LFR) used for 3 methods, those are DPPH radical scavenging activity, Nitric oxide(NO) radical scavenging activity, Superoxide anion radical scavenging activity, 2) cultivation 3T3-L1 Preadipocytes and Protein chip used for ProteoPlex™ 16-Well Murine Cytokine Array Kit. We measured level of DPPH radical scavenging activity. And we experienced that the ability of DPPH radical's elimination was increased by rising concentration of LFR. When the concentration of LFR was 5 mg/ml, the ability of DPPH radical's elimination was Maximum. We measured level of Nitric oxide(NO) radical scavenging activity. And we founded that the ability of NO radical's elimination was significant when concentration of LFR was from 1.25 mg/ml to 2.5 mg/ml. We measured level of Superoxide anion radical scavenging activity. And we founded that the ability of Superoxide anion radical's elimination was maximum when concentration of LFR was 0.3125 mg. When we inspected Antioxidative Effects with BSA, we experienced that ability of defense was increased by rising concentration of LFR. We known the immunity of LFR about 3T3-L1 Preadipocytes and gained the increase of Cytokines(IL-2, IL-4, GM-CSF) without IL-12p70, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . So I guess that Luffae Fructus Retinervus(LFR) has effects of anti-aging, disease-protection, long-life, etc.

Key words : Luffae Fructus Retinervus(LFR), antioxidative effect, 3T3-L1 cell, immunity

### 서론

최근 사회가 급속도로 고령화 사회에 접어들면서 항노화에 관한 관심이 높아지고 있으며, 또한 산업의 발달, 식생활의 변화 및 환경오염원들은 인간의 면역계에도 영향을 미쳐 다양한 질병을 일으키는 원인으로 알려져 있다. 이들 요인 이외에 생체 내에서 일어나는 에너지 공급을 위한 생화학적 반응인 산화 작용은 끊임없이 일어나며 이 과정에서 항상 발생하는 활성산소 및 상

당량의 free radical<sup>1)</sup>은 근본적으로는 자기방어 기구인 생체 내 제거 기작에 의해 대부분 소멸되지만, 조직의 방어능을 초월한 활성산소 및 free radical<sup>2)</sup>의 생성은 최근 류마티스성 관절염, 심장병, 파킨슨씨병, 순환기 장애와 암 등의 성인병과 노화의 원인이 되고 있다.

활성산소는 단백질과 DNA의 손상 및 세포막 지질의 과산화 반응을 촉진시킴으로서 노화를 유발할 뿐만 아니라, 당뇨병, 심장병, 신부전, 암 등 여러 가지 급만성 질환의 병인으로 인정되고 있다<sup>3-6)</sup>.

絲瓜絡(Luffae Fructus Retinervus)은 肺, 胃, 肝經으로 歸經하며<sup>7)</sup>, 通經活絡, 清熱化痰하는 效能이 있어 胸脇疼痛, 腹痛, 腰痛, 肺熱痰咳, 婦女經閉<sup>8)</sup>, 癰疽瘡瘍<sup>9)</sup>, 痘疹胎毒<sup>10)</sup> 등을 치료한다.

\* 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속한방병원

· E-mail : omdcha@sangji.ac.kr, · Tel : 033-741-9260(1)

· 접수 : 2007/06/25 · 채택 : 2007/07/20

絲瓜絡에 관한 연구로는 채<sup>11)</sup> 등의 류마티오이드 관절염에 대한 효과, 남<sup>12)</sup> 등의 喘息抑制 및 면역조절효과에 대한 연구가 있었는데 모두 絲瓜絡 藥鍼液을 사용하여 실험동물에 미치는 영향에 대해 유의한 결과를 얻은 실험이었다. 이는 絲瓜絡의 通經活絡, 清熱化痰의 효능으로 인해 대사과정에서 발생하는 노폐물 혹은 독소를 제거하고 면역력에 관여하여 효과를 나타내는 것으로 보이며, 이에 저자는 絲瓜絡 추출물의 항산화 작용과 면역력 향상에 대한 영향을 알아보기 위하여 이 실험을 하게 되었다. 絲瓜絡의 항산화 효과 및 3T3-L1 세포 분화 시 cytokine류에 미치는 영향을 Protein chip 변화양상을 통해 분석해 보았으며 다음의 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) Cell line

본 실험에서는 3T3-L1 세포주를 한국세포주은행에서 분양 받아서 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 絲瓜絡(Luffae Fructus Retinervus (LFR), 한국, 2006)은 제일약업사(강원도 원주)에서 구입하였고 상지대학교 부속한방병원 약제실에서 검증받았다.

絲瓜絡을 세정하여 5000 ml 등근 플라스크에 한약재 100 g, 증류수를 3000 ml를 넣고 3시간 동안 다린 후 16겹의 거즈로 거르고, 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 건조 후 수율은 11.38%였다.

### 2. 방법

#### 1) 絲瓜絡을 다려서 filtration하는 방법

먼저 絲瓜絡을 다려서 filtration을 하였는데, 5000 ml 등근 플라스크에 絲瓜絡 100 g, 증류수를 3000 ml를 넣고 3시간 동안 다린 후 거즈 16겹을 깔고 한약재 다린 물을 거른 다음에 filter paper 2겹으로 filtration을 하였다. 그 후 membrane filter 0.8 μm 로 filtration을 하고, 다시 membrane filter 0.45 μm, 0.2 μm로 filtration하여 추출물을 얻었다.

#### 2) DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity

항산화능을 측정하기 위하여 동결건조 된 絲瓜絡의 농도는 5 mg/ml를 최초의 농도로 하여<sup>13)</sup> 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.3125 mg/ml가 되게 PBS에 희석하였다. 실험에 사용한 시료는 0.2 μm membrane filter(Whatman, U.S.A)로 filtration 하였다.

1 ml tube에 DPPH 400 μl, 추출물 농도별 40 μl를 넣고 최종농도가 800 μl가 되도록 PBS로 맞추고 vortex로 섞었다. 그 후 실온에서 빛을 차단시키며 30분간 방치하였다. Positive control로 ascorbic acid, gultathione, BHT, gallic acid, quercetin을 사용하였다. 그 후 바닥이 편평한 96 Well Plate에 200 μl씩 3set로 분주하여 ELISA reader에서 540 nm 파장으로 측정하였다.

DPPH radical-scavenging activity는 아래의 공식에 의하여 계산하였다.

$$\% \text{ Decolorization} = [1 - (\text{ABSsample} / \text{ABScontrol})] * 100$$

#### 3) Nitric oxide(NO) radical scavenging activity<sup>14)</sup>

Nitric oxide(NO)를 포함한 여러 가지 free radical은 질병과 연관되어 있는데, NO는 O<sub>2</sub>와 반응하여 안정된 nitrite와 nitrate를 생성하며, O<sub>2</sub>와 경쟁하는 NO 유리기는 nitrite의 생성을 감소한다. nitrite의 농도를 Greiss reagent를 사용해 흡광도를 측정함으로써 NO 억제능을 측정한다.

실험 시작 전에 Sodium nitroprusside(SNP, Sigma, U.S.A)를 PBS buffer에 10 mM이 되도록 녹였다. 1.5 ml tube에 다양한 농도의 시료 500 μl와 10 mM SNP 500 μl를 섞어주고 25°C에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 96 well plate에 반응한 mixture(絲瓜絡+SNP) 100 μl를 넣고 Greiss reagent 100 μl를 첨가하고 ELISA reader(Molecular Device, U.S.A)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 control(한약재 0 μl)과 비교한 nitrite 생성 %를 계산한다.

$$\% \text{ Scavenging effect} = [1 - (\text{nitrite concentration of sample} / \text{nitrite concentration of control}) * 100^{15)}$$

#### 4) Superoxide anion radical scavenging activity<sup>16)</sup>

Superoxide는 xanthine oxidase에 의해 xanthine의 산화에서 uric acid로 되는 과정에서 생성된다. superoxide는 nitroblue tetrazolium(NBT)와의 반응에서 밝은 노란색에서 진보라색으로 변화되는데 이를 분광광도계를 통하여 측정한다. 항산화제의 항산화능은 NBT의 환원 억제능력을 측정하는 것이다.

Superoxide anion radical scavenging activity 측정방법은 아래와 같다. 10 mM xantine을 0.05 mM EDTA를 포함한 phosphate buffer(pH 7.4)에 녹였다. 1.5 ml tube에 1 mM nitroblue tetrazolium(NBT, Sigma, U.S.A)를 0.05 mM EDTA를 포함한 phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 후 10 mM xanthine 45 μl, 1 mM NBT 45 μl, sample 10 μl, xanthine oxidase(0.5 U/ml) 10 μl를 혼합하여 37°C incubator에서 30분간 반응하였다. reaction mixture를 540 nm에서 흡광도 측정하였다. superoxide 소거능력은 DPPH의 경우처럼 DPPH의 공식을 이용해 계산하였다.

$$\% \text{ Sacvenging} = [1 - (\text{ABSsample} / \text{ABScontrol})] * 100^{17)}$$

#### 5) BSA를 이용한 항산화 효과 검증

1.5 ml tube에 각 농도별 시료 10 μl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 μl, Cu<sup>2+</sup> 5 μl, PBS 42.5 μl를 섞은 후 37°C water bath에서 2시간동안 반응하였다. 그 후 Bovine serum albumin(BSA, Sigma, U.S.A) 12.5 μl씩 첨가하고 37°C water bath에서 2시간동안 반응하였다. 그 후 5× Loading dye 12 μl 첨가한 뒤, 12.5% SDS-PAGE를 실시하고 Coomassie Blue 시약으로 Gel 염색과 탈염색을 실시 후 Gel을 Scanning(HUMAX, Korea) 하였다.

#### 6) Cytokines 실험

##### (1) sample 준비

Mouse embryo 3T3-L1 전지방세포주를 2×10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 부유시켜 48시간 배양한 뒤 DMEM배지로 교체하였다. 이를 더 배양한 뒤 confluent상태가 되었을 때 분화배지 (10% FBS, 1% Penicillin/streptomycin, 5 μg/ml insulin, 1 uM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine)로 교체하여 2일간 배양하였다. 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 5 μg/

ml insulin이 포함된 DMEM와 한약재를 처리하여 3일간 배양하고 배지 상등액을 취해, 5,000 × g, 4℃, 5분 동안 원심분리해서 cell debris를 제거하고 상등액을 가지고 실험하였다.

(2) Proteoplex™ 16-Well Murine Cytokine Array Protocol

1.25 ml 1× Sample Diluent를 Murine Cytokine Standard Mix 1 powder와 섞어 Cytokine Standard를 준비하고 serial dilution해서 800, 400, 133, 44, 15 pg/ml이 되도록 준비하였다. PBST로 2번 slide를 wash하고 배지상등액과 Sample Diluent를 1:1비율로 희석하였다. sample과 standard 100 µl를 well에 loading하고 1시간 동안 실온에서 incubation하였고 PBST로 4번 wash하였다. reconstituted Murine Detection Antibody Cocktail 1을 slide의 각 well에 80 µl loading하고 1시간 동안 실온에서 incubation하였다. PBST로 4번 wash하고 reconstituted SensiLight PBXL-3을 slide의 각 well에 100 µl loading하였다. 1시간 30분 동안 실온에서 incubation하고 PBST로 4번 wash하고 slide를 분리하였다. 1× Rinse Solution으로 채워진 Slide Rinser에 10초 동안 slide를 넣었고 Slide Dryer에 slide를 넣고 200 × g, 1분 동안 원심분리하며 말린 후 slide를 scan(GenePix 4000B, Axon Instruments, U.S.A)하였다(excitation: 635 nm, emission: 660 nm, resolution: 10 µm).

7) 통계 분석

絲瓜絡이 3T3-L1 지방세포 분화 시 cytokine에 미치는 영향에 관한 유의성 평가는 SPSS7.5 for windows(SPSS, Inc.)를 이용하여 Student T-test를 실시하여 P<0.05를 유의성 있다고 하였다.

결 과

1. DPPH radical scavenging activity

항산화효과를 검증하는 대표적인 방법인 DPPH radical을 사용하였다. 絲瓜絡의 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 mg/ml 까지 사용하였으며 0 mg/ml를 0%로 하여 농도별 소거능을 측정하였다. 농도가 증가함에 따라 소거능이 5 mg/ml까지 지속적으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1, Table 1).

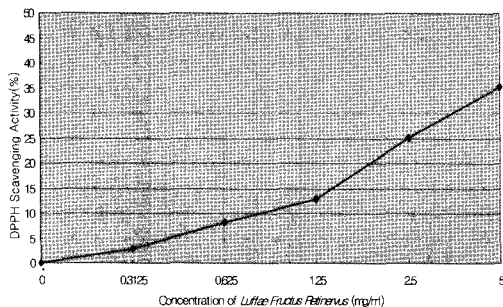


Fig. 1. DPPH Scavenging activity(%)

Table 1. DPPH Radical Scavenging Activity(%)

LFR (mg/ml)	0.3125	0.625	1.25	2.5	5
scavenging activity(%)	2.79	8.13	12.79	25.11	35.38

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. LFR:Luffae Fructus Retinervis

2. Nitric oxide(NO) radical scavenging activity

Nitric oxide(NO) radical scavenging activity를 측정하기 위하여 絲瓜絡의 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 mg/ml까지 사용하였으며 0 mg/ml를 0%로 하여 농도별 제거능을 측정하였다.

1.25 mg/ml까지 농도별로 증가하는 경향을 보이다가 이후 감소하는 결과를 얻었다(Fig. 2, Table 2).

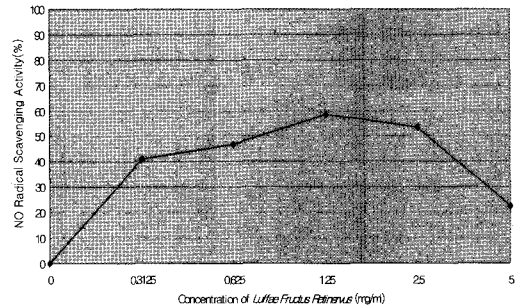


Fig. 2. NO Radical Scavenging Activity(%)

Table 2. NO Radical Scavenging Activity(%)

LFR (mg/ml)	0.3125	0.625	1.25	2.5	5
scavenging activity(%)	40.83	47.02	58.65	53.35	22.5

NO : Nitric Oxide. LFR:Luffae Fructus Retinervis

3. Superoxide anion radical scavenging activity

Superoxide anion radical scavenging activity(%)를 측정하기 위하여 絲瓜絡의 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 mg/ml까지 사용하였으며 0 mg/ml를 0%로 하여 농도별 제거능을 측정하였다. 0.3125 mg/ml에서 가장 높게 나타나고 이후 감소하는 경향을 보이다가 2.5 mg/ml에서 다시 증가하였고 2.5 mg/ml이후 감소하는 결과를 얻었다(Fig. 3, Table 3).

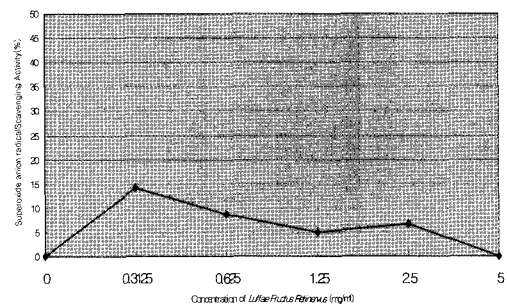


Fig. 3. Superoxide radical Scavenging activity(%)

Table 3. Superoxide anion radical scavenging activity

LFR (mg/ml)	0.3125	0.625	1.25	2.5	5
scavenging activity(%)	14.24	8.8	4.97	6.78	0

LFR : Luffae Fructus Retinervis

4. BSA를 이용한 항산화 효과 검증

Bovine Serum albumin(BSA)를 이용하여 항산화 효과를 검증하였다. 絲瓜絡의 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 mg/ml까지 사용하였으며 0 mg/ml를 0%로 하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 방어능을

확인하였다. 2.5 mg/ml의 농도에서부터 방어능이 증가하는 경향을 보이고 있으며, 5 mg/ml에서 가장 높았다(Fig. 4).

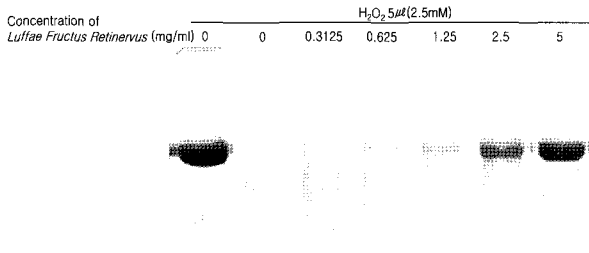


Fig. 4. antioxidative effect using BSA

5. 絲瓜絡이 3T3-L1 세포 분화 시 cytokine에 미치는 영향  
 발현되는 cytokine은 IL-12p70과 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 를 제외하고 모두 대조군에 비하여 증가하는 경향을 결과를 얻었다(Fig. 5, 6).



Fig. 5. Images of cytokine expression in 3T3-L1

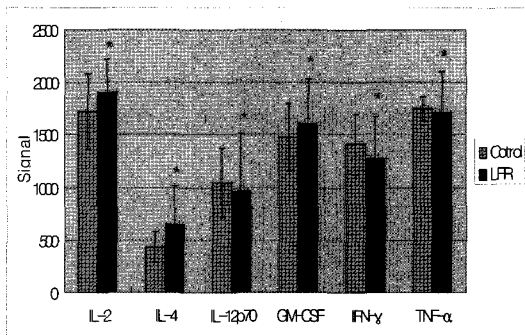


Fig. 6. Change of Cytokine in 3T3-L1. LFR: Luffae Fructus Retinervis(P(0.05))

## 고찰

노화란 생체의 생리적 재생 기능의 점진적인 감약에 의해서 생체 장기조직의 세포 수 감소와 이로 인한 인체의 전반에 걸친 기능저하라고 할 수가 있다<sup>18)</sup>. 지금까지 밝혀진 노화이론은 크게 보아 프로그램설 또는 유전적 이론과 확률론 또는 손상축적이론으로 나뉜다. 그 외에도 Collagen 이론, 교차결합(Cross-linking) 이론, 내분비선 이론, 프로그램 노화이론, 면역이론 등 많은 노화관련 이론들이 있으나 생리적인 변화가 각 개체에 따라 다르게 나타나는 이유에 대해 계속 연구되고 있다.

이와 관련하여 1955년 Harman<sup>19)</sup>에 의해 제기된 free radical 이론이 지금까지 많은 관심을 불러일으키고 있고 설득력을 얻고

있다. 이는 활성산소에 의한 세포의 산화 스트레스설인데 나이가 들어가면서 점진적으로 축적되는 활성산소가 생체 내 여러 소기관에서 산화기작을 통해 생성되는 과산화수소와 함께 DNA, 단백질 그리고 지질 등을 손상하면서 노화 촉진을 일으킨다는 것이다<sup>20)</sup>. 원래 이러한 활성산소는 염증 부위를 제거하기 위한 또 하나의 생체 방어기전으로 백혈구가 염증 부위에 활성산소를 뿌리게 되는데 이때 그 부위의 정상세포도 피해를 주게 되므로 문제를 증폭시킬 수도 있게 된다<sup>18)</sup>. 이때 free radical이 세포 내에서 거대분자, 부 세포성 성분 또는 세포, 조직에서 생성될 때 독성을 일으켜 질병을 일으키는데 주요 요인은 O<sup>2</sup>의 과잉생성이 과립백혈구나 대식세포의 활성화, Xanthine dehydrogenase에서 Xanthine oxidase로 전환, 생체이물질의 환원 사이클 또는 SOD의 활성 감소, 산소 과다증을 야기하는 것이다.

오늘날 superoxide의 독성이 세포손상, 지질과산화의 증가라는 과정을 통해 병인이 된다고 알려져 있다<sup>20)</sup>. 이러한 작용을 방어하기 위해 체내에서는 SOD, catalase, glutathione, Nitric acid 등의 내부항산화제를 갖고 있으며 최근에는 이러한 작용을 돕는 항산화제로 vitamin C, E, A, selenium, flavonoids, 녹차, 홍삼, 루이보스, milk thistle, 은행잎, 마늘, 양파, 토마토, 적포도주 등 약재와 식품에 걸쳐 많은 연구가 이루어지고 있다.

한의학에서는 腎은 先天之本으로 《素問·上古天眞論》<sup>21)</sup>에서 노화의 자연적인 과정은 腎이 주관하는 것으로 보았고, 이를 촉진하고 질병을 일으키는 것은 濕, 痰, 熱, 瘀血 등의 병리적 산물이 체내 환경(經絡, 臟腑)에 쌓여 일어나는 것으로 보았다.

이러한 관점에서 보면 활성산소라는 병리적 산물로 노화와 질병을 일으키는 것에 대한 한의학적인 치료법으로는 經絡을 疏通시키고 濕熱痰 등의 노폐물을 제거하는 방법이라고 생각한다. 그 중에서도 通經活絡하고 清熱化痰의 효능이 있다고 알려져 있는 絲瓜絡이 이미 藥鍼液을 이용한 동물실험에서 관절염 및 천식억제의 효과가 있다<sup>11,12)</sup>고 하였으나 絲瓜絡 자체의 근본적인 항산화능력과 면역능력에 대한 실험은 없어서 絲瓜絡의 항산화 효과 및 세포주 분화 시의 Cytokine류에 미치는 영향을 통해 면역력 등을 알아보았다.

絲瓜絡(Luffae Fructus Retinervis)은 葫蘆科(박과 Cucurbitaceae)에 속한 一年生 덩굴성식물인 수세미오이 Luffa cylindrica (L.) Roem.의 成熟한 果實을 採取하여 外皮와 果肉을 除去한 網狀의 纖維質을 乾燥한 것이다<sup>7)</sup>.

실험방법은 絲瓜絡을 달여 filtration 하고 동결 건조시켜 사용하였으며 이를 각각 DPPH radical, Nitric oxide(NO) radical, Superoxide anion radical scavenging activity 및 BSA를 이용한 항산화효과를 측정하기 위해서 PBS buffer에 희석하여 농도별(5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 mg/ml)로 분석하였다.

실험 결과 첫 번째 DPPH radical scavenging activity의 측정법에서는 絲瓜絡의 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 mg/ml 까지 사용하였으며 0 mg/ml를 0%로 하여 농도별 소거능을 측정하였다. 농도가 증가함에 따라 소거능이 5 mg/ml까지 지속적으로 증가하는 경향을 보였는데 각각 2.79, 8.13, 12.79, 25.11, 35.38%로 나타났다.

Nitric oxide(NO) radical scavenging activity의 측정법에서는 絲瓜絡의 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 mg/ml까지 사용하였으며 0 mg/ml를 0%로 하여 농도별 소거능을 측정하였다.

농도가 증가함에 따라 소거능이 1.25 mg/ml까지 지속적으로 증가하는 경향을 보였는데 각각 40.83, 47.02, 58.65% 이었으며 그 이후부터는 53.35, 22.5%로 감소하는 결과를 얻었다.

Superoxide anion radical scavenging activity의 측정법에서는 絲瓜絡의 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 mg/ml까지 사용하였으며 0 mg/ml를 0%로 하여 농도별 소거능을 측정하였다.

0.3125 mg/ml에서 14.24%로 소거능이 가장 높게 나타나고 이후 8.8, 4.97%로 감소하는 경향을 보이다가 2.5 mg/ml에서 6.78%로 다시 증가하였고 5 mg/ml에서의 농도에서는 0으로 나타나 소거능이 없는 것으로 나타났다.

Bovine Serum albumin(BSA)를 이용하여 항산화 효과를 검증한 실험에서는 絲瓜絡의 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0 mg/ml까지 사용하였으며 0 mg/ml를 0%로 하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 방어능을 확인하였는데, 2.5 mg/ml의 농도에서부터 방어능이 증가하는 경향을 보였고, 5 mg/ml에서 가장 높은 결과를 얻었다.

이상의 결과를 볼 때 각각의 실험 방법에 따른 농도별 효능에 약간의 차이가 있었으며, 향후 추가실험을 통하여 환자에게 적당한 양의 한약이 투여될 수 있도록 지표가 될 수 있는 실험이 필요할 것으로 생각된다.

絲瓜絡에 대한 한의학계의 연구<sup>11,12</sup>) 외에 다른 연구로 絲瓜絡의 부위별 유효성분 조사에 대한 실험이 있었는데, 잎, 줄기, 종자, 과즙, 꽃 중에서 종자에 가장 많은 유효성분이 있는 것으로 보고되어 향후 다른 약용부위에 관한 연구도 필요할 것으로 보인다<sup>22-24</sup>).

한의학은 본래 正氣存內 邪不可干<sup>25</sup>)이라 하여 正氣가 체내에 존재하고 있으면 邪氣가 침범할 수 없다는 관점을 갖고 있는데, 이는 생체 내의 방어 메카니즘에 의해 질병을 물리친다는 면역학적 관점과 많은 공통점을 가지고 있다. 이런 관점에서 본 실험에서는 면역기능과의 연관성을 알아보고자 Mouse embryo 3T3-L1 전지방세포주를 이용하여 분화 시 絲瓜絡이 cytokine류에 미치는 영향을 측정하였는데 면역반응조절에 중요한 역할을 하는 IL-2, IL-4, IL-12p70, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  의 6가지에 대한 결과를 보았다.

면역이란 생체의 내부 환경이 외부 인자에 대하여 방어하는 현상으로 자기와 비자기를 구분하여 비자기를 항원으로 인식하여 체내환경을 보호하는 것이다. 외부 인자를 항원이라 하며, 병원미생물 또는 그 생성물, 음식물, 화학물질, 약, 꽃가루, 동물의 분변 등을 들 수 있다. 면역계는 병원체에 대해 방어를 제공하는 구조와 반응시스템을 갖고 있는데 크게 태어날 때부터 지니고 있는 선천면역과 후천적으로 생활 등에 적응되어 얻어지는 획득면역으로 구분 된다<sup>26</sup>).

면역을 담당하는 세포 중 하나인 림프구에 있는 T세포는 세포막에 존재하는 단백질 종류에 의해 크게 CD4라는 단백질을 갖는 CD4+T세포와 CD8이라는 단백질을 갖는 CD8+T세포로 나뉘어 지는데, 그 중 CD4+T세포는 일명 helper T세포라고 불리

며, Th1과 Th2 2가지로 나뉘어 지는데, Th1세포는 대식세포 활성화작용 및 killer T세포의 활성화작용을 하는 T세포이고, Th2 세포는 항체생산작용을 하는 T세포이다. Th1과 Th2는 같은 CD4+T세포이지만 방출하는 cytokine이 다르다. Th1이 방출하는 cytokine은 IL-2, IFN- $\gamma$  등이고, Th2가 방출하는 cytokine은 IL-4, IL-5, IL-6이다<sup>27</sup>).

그 중 IL-2 (Interleukin-2)는 killer 세포의 활성화 및 B세포와 NK cell의 증식을 촉진시키는데 Morgan<sup>28</sup>)에 의해 최초로 발견된 T세포 성장인자로 항원 특이적 및 비특이적인 자극을 받은 helper T cell 및 LGL(large granular lymphocyte)에서 생산되는 lymphokine의 일종으로서 그 기능은 T세포의 성장 이외에 B세포의 분화인자유도, 세포독성 임파구 NK cell과 대식세포 등의 증식 및 활성화에 관여하여 면역기능의 향진과 저하에 매우 중요한 역할을 하고 있다<sup>29</sup>).

IL-4는 B세포를 형질세포로 분화시켜, 항체 생산을 촉진하는 작용을 하는데 B세포가 IgG1과 IgE를 생성하도록 활성화와 분화를 유발하기도 하고 성장인자와 활성인자로서 T세포에 작용한다. 또 대식세포에서는 MHC class II의 발현을 유발하는 반면 사이토카인의 생성을 억제한다. IL-4가 과량 생산되면 IgE의 생성이 증가하여 알러지를 일으킨다<sup>30</sup>).

IL-12p70는 대식세포와 NK cell의 활동촉진과 IFN- $\gamma$  생성을 유발한다<sup>31</sup>).

GM-CSF(과립구 대식세포 집락 자극인자)는 활성화된 T 림프구, 대식세포, 내피세포, 그리고 기질 섬유아세포에 의해 합성되며, 골수에 작용하여 염증성 백혈구의 생산을 증가시키는 작용을 하는 사이토카인이이기도 하고, 랑게르한스 세포로부터 수지상세포로의 분화를 촉진하는 역할을 한다.

종양에 대해서도 동물실험을 통해 IL-2, IL-4, INF- $\gamma$ , GM-CSF 유전자를 삽입한 설치류 종양을 동물에 주입하면 종양은 거부되거나 퇴축된다<sup>32</sup>)는 실험 결과들이 있다.

IFN- $\gamma$ 는 면역인터페론 혹은 제 II형 인터페론으로 부르고 있으며, 대식세포와 NK cell을 활성화시키며, 이는 활성화된 CD4+및 CD8+ T 림프구, 그리고 NK cell에 의해 생성된다. 전사는 항원에 의한 활성화의 결과 즉각적으로 시작되며, IL-2와 IL-12에 의해 증진되고, 자연 면역의 매개자로서의 기능을 가지며 패혈성 쇼크에 관계하기도 한다<sup>32</sup>).

TNF- $\alpha$ (종양괴사인자)는 그람-음성 세균에 대한 반응의 주된 매개자이며, 그리고 또한 다른 감염성 미생물에 대한 자연면역반응에 있어 어떤 역할을 담당하는 것으로 생각된다. T림프구에 의해 생성되는 IFN- $\gamma$ 는 LPS에 의해 자극된 단핵식균세포로부터의 TNF 합성을 증가시킨다. 이와 같이 TNF는 자연 및 특이 면역의 매개자이며 특이면역반응과 급성 염증반응의 중요한 연결자이다<sup>32</sup>).

본 실험에서는 IL-2, IL-4, GM-CSF는 signal이 유의성 있게 증가하였으나, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 는 감소한 결과가 나왔다.

IL-2, IL-4, GM-CSF는 면역기능의 향진과 저하에 중요한 역할을 하는데, 絲瓜絡의 cytokine이 대조군에 비해 증가한 것으로 보아, 면역능력 향상에 효과가 있을 것으로 생각된다.

IFN- $\gamma$ 는 Ig-G의 항체를 활성화 시키는데 이것이 지나치면 과잉 면역반응이 일어나 II형, III형 알러지를 일으키는데<sup>33)</sup> 絲瓜絡이 대조군에 비하여 감소한 것으로 보아 알러지에 대해 방어하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

TNF- $\alpha$ 는 염증성 cytokine으로 종양의 출혈성 괴사를 유도하는 작용을 하지만 연골이나 뼈를 파괴하는 물질(MMP)의 방출을 유도하는 것이 지나치면 관절에 압박을 가하는 염증이 지속되기 때문에 류머티즘과 같이 심한 통증을 느끼게 되는데<sup>33)</sup> 絲瓜絡이 대조군에 비해 감소하는 것으로 보아 관절염의 통증 감소에도 효과가 있을 것으로 유추된다.

한의학적으로 보면 絲瓜絡은 면역력과 연관되는 正氣를 지키는데 도움이 되며, 알러지, 관절염, 종양 등을 일으킬 수 있는 외부 邪氣에 대한 방어 작용도 있다고 볼 수 있다.

IL-12p70은 대식세포와 NK cell의 활동촉진과 IFN- $\gamma$  생성을 유발하는 작용을 하는 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 감소한 결과가 나와 향후 이에 대한 보충 실험이 더 필요할 것으로 생각된다.

이상의 실험결과를 통해 絲瓜絡은 면역능력을 향상시키고 항산화 효과를 가지고 있으며 이를 통한 성인병 및 노화예방에 효과가 있을 것으로 유추되며, 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

絲瓜絡의 항산화 효과와 3T3-L1 세포의 분화시 cytokine류에 미치는 영향을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

DPPH radical scavenging activity를 측정된 결과 絲瓜絡의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 5 mg/ml 까지 유의성 있게 증가하는 경향을 보였다. Nitric oxide(NO) radical scavenging activity를 측정된 결과 NO radical 소거능이 유의성 있게 증가하는 경향을 보였으며, 1.25 mg/ml에서 최대로 증가하다가 이후 감소하는 결과를 얻었다. Superoxide anion radical scavenging activity를 측정된 결과 0.3125 mg/ml에서 가장 높게 나타나고 이후 감소하는 경향을 보이다가 2.5 mg/ml에서 다시 증가하였고 2.5 mg/ml이후 감소하는 결과를 얻었다. BSA를 이용한 항산화 효과 검증에서는 2.5 mg/ml의 농도에서부터 방어능이 증가하는 경향을 보이고 있으며, 5 mg/ml에서 가장 높았다. 絲瓜絡 추출물을 투여한 3T3-L1 세포를 Protein chip으로 cytokine에 미치는 영향을 분석한 결과 발현되는 cytokine은 IL-12p70과 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 는 signal이 감소하였으며, IL-2, IL-4, GM-CSF는 signal이 증가하였다.

이상으로 볼 때 絲瓜絡 추출물은 항산화 작용과 면역력 향상에 효과가 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년도 하반기 상지대학교 교내연구비 지원에 의한 것입니다.

## 참고문헌

1. Barja, G. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 79(2):235-251, 2004.
2. Poom, H.F., Calabrese, V., Scapagnini, G., Buterfield, D.A. Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med.* 20(2):329-359, 2004.
3. Harman, D. Free radical theory of aging : Role of free radicals in the organization and evolution of life. aging and disease processes, *Free Radicals, Agind and Degenerative Disease*(ed. Johnson, J.E et al), alan R. Liss. Inc., New York, pp 3-49, 1986.
4. 張文彭 外. 清宮長春丹對老年腎虛證血漿過氧化脂質高密度脂蛋白膽固醇水平影響的研究. *中醫雜誌* 30(3):34-38, 1989.
5. Batteli, N.G., Lorenzoni, E., Stripe, F. Milk xanthine oxidase type D(dehydrogenase) and type O(oxydase).:Purification and interconversion and some properties, *Biochem. J.* 131: 191-198, 1973.
6. Simon, R.H., Scogging, C.M., Patterson, D. Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblast exposed to the oxygen radicals, *J. Biol. Chem.* 266: 7181-7186, 1981.
7. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울, 永林社, pp 278-279, 1998.
8. 中藥大辭典編纂委員會編. 中藥大辭典(卷下). 臺北, 新文豐出版公司, p 2028, 1982.
9. 黃宮繡. 本草求真. 北京, 人民衛生出版社, p 266, 1987.
10. 李時珍 著. 圖解本草綱目(下冊). 臺北, 文光圖書有限公司, pp 974-975, 1982.
11. 채충현, 최선미, 임윤경. 족삼리絲瓜絡약침이 생쥐의Collagen-induced Arthritis에 미치는 영향. *대한침구학회지* 2005.
12. 남세현, 이현, 홍권의. 사과라(絲瓜絡) 약침의 천식억제(喘息抑制) 및 면역조절효과에 대한 실험적 연구. *대한침구학회지* 2005.
13. Kai-Jin Wang, Ying-Jun Zhang, Chong-Ren Yang. Antioxidant phenolic constituents from Fagopyrum dibortrys. *Journal of Ethnopharmacology.* 99: 259-264, 2005.
14. Manjeshwar Shrinath Baliga, Ganesh Chandra Janetia, Shaival Kamalakasha Rao, Kiran Babu S. Evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain spices in vitro :A preliminary study. *Nahrung/Food.* 47(4):261-264, 2003.
15. Jung-Yi Bor, Hui-Yin Chen, Gow-chin Yen. Evaluation of antioxidant and Inhibitory effects on Nitric Oxide Production of Some Common Vegetables. *J. Agric. Doof Chem.* 54: 1680-1686, 2006.
16. Peter M. Hanson, Ray-Yu Yang, Samson C.S. Tsou, Dolores Ledesma, Liwayway Engle, Tung-Ching Lee. Diversity in

- eggplant(*Solanum melongna*) for superoxide scavenging activity, total phenolics, and ascorbic acid. *Journal of food composition and analysis* 19: 594-600. 2006.
17. Hyeon-Hee Yu, Se-Jeong Seo, Yeon-Hwa Kim, Hae-Youn Lee, Rae-Kil Park, Hong-Seob So, Seon Il Jang, Yong-Ouk You. Protective effect of *Rehmannia glutinosa* on the cisplatin-induced damage of HEI-OC1 auditory cells through scavenging free radicals. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 383-388, 2006.
  18. 손장락. 활성산소와 항산화제. 서울, (주)바이오메디칼, p 130, 154, 2004.
  19. Harman, D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 5: 557-561, 2003.
  20. 김영곤. 항산화제(Antioxidants). 서울, 여문각, p 231, 275, 2004.
  21. 홍원식 편. 정교황제내경. 서울, 여문각, 東洋醫學研究院. pp 11, 19-20, 246, 301, 1981.
  22. 장기운, 문창식, 이희덕, 이창준, 이운철. 수세미외의 부위별 유효성분 조사 및 사과라중(絲瓜絡中) 육질제거 방법 개발 연구 : (I) 수세미외의 부위별 화학성분 분석. 한국응용생명화학회(구 한국농화학회), 한국응용생명화학회지(구 한국농화학회지) 1991.
  23. 유태방, 장기운, 안병창, 신종순, 박종상. 수세미외의 부위별 유효성분 조사 및 사과라중(絲瓜絡中) 육질제거 방법 개발 연구 : (II) 사과라 육질제거 및 섬유품질개선. 한국응용생명화학회(구 한국농화학회), 한국응용생명화학회지(구 한국농화학회지) 1991.
  24. 배기환, 지종명, 장기운. 수세미오이의 부위별 유효성분 조사 및 사과라의 육질제거에 관한 연구 : (III) 잎, 줄기 및 종자의 L1210 세포에 대한 세포독성과 증치균에 대한 항균작용. 한국생약학회, 생약학회지 1991.
  25. 王琦, 李炳文, 邱德汶, 王慶冀, 彭榮琛 編著. 黃帝內經素問今釋. 서울, 성보사, p 1, 2, 28, 412, 1983.
  26. Stuart Ira Fox. 생리학. 서울, 라이프사이언스 328, 2003.
  27. 新谷太. Pathophysiology로 이해하는 내과학 권 7. 면역, 알레르기 질환. 정담, pp 5-11, 2002.
  28. Morgan, D.A., Ruscetzi, F.W., Gallo, R.C. Selective in vitro growth T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science* 193: 107, 1976.
  29. 김세종. 면역학. 서울, 고려의학, pp 259-265, 1994.
  30. 하대유. 그림으로 본 면역학. 서울, 고문사, p 103, 1994.
  31. Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David male. *Immunology*. Mosby 8: 11, 1996.
  32. 김광혁 외. 세포 분자 면역학. 서울, 정문각, p 307, 308, 320, 329, 467, 1998.
  33. 하기와라 기요후미 저. 내 몸 안의 주치의. 전나무숲, p 37, 114, 115, 116, 130, 2006.