

大薊 추출물의 활성산소 소거능 및 Cytochrome P450 효소 저해효과

김혁[#], 이효승, 박원환, 문진영^{*}

동국대학교 한의과대학 및 심혈관계질환 천연물개발연구센터

Scavenging Activity of Reactive Oxygen Species and Inhibitory Effect of Cytochrome P450 from the *Cirsium japonicum* Extract

Hyuck Kim[#], Hyo-Seung Yi, Won-Hwan Park, Jin-Young Moon^{*}

College of Oriental Medicine, Dongguk University and Cardiovascular Medical Research Center, Kyungju,
Korea

ABSTRACT

Objectives : Our previous studies have clearly demonstrated that the scavenging activity of reactive oxygen species (ROS), protective effect of lipid peroxidation (LPO), and inhibition of cytochrome P450 isozymes (CYPs) from the *Cirsium japonicum* aqua-acupuncture solution (CJAS). But, *Cirsium japonicum* water extracted solution (CJWS) was weakly reported in cardiovascular diseases such as oxidative stress-mediated atherosclerosis or its value evaluated.

Methods : CJWS was assessed to determine the mechanism of its scavenging activity of ROS and inhibitory effect of CYP 2E1.

Results : CJWS exhibited a concentration-dependent scavenger of DPPH and superoxide anions radicals using different assay systems. In addition, CJWS showed dose-dependent free radical scavenging activity, including hydroxyl radicals, peroxynitrite, and nitric oxide. The CJWS was also found to be effective in protecting rat liver homogenate against LPO. Furthermore, the CJWS showed significant inhibition of CYP 2E1 induced by pyrazol in a rat liver microsome.

Conclusion : ROS and CYPs may play a role in several diseases, such as cardiovascular disease and heart failure. Our study demonstrated that the CJWS has excellent scavenging activity of ROS. Hence, it is worthwhile to investigate the potential effectiveness of CJWS in preventing oxidative stress-mediated cardiovascular diseases.

Key words : *Cirsium japonicum*, reactive oxygen species, lipid peroxidation, cytochrome P450, cardiovascular diseases, atherosclerosis

#제1저자 : 김혁, 동국대학교 심혈관계질환 천연물개발연구센터

· Tel: 054-770-2375 · Fax: 054-770-2376 · E-mail: amp@dongguk.ac.kr

*교신저자 : 문진영, 동국대학교 한의과대학 경혈학교실

· Tel: 054-770-2665 · Fax: 054-770-2649 · E-mail: ampmoon@dongguk.ac.kr

· 접수 : 2007년 02월 06일 · 수정 : 2007년 03월 06일 · 채택 : 2007년 03월 20일

서 론

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 스트레스 (oxidative stress)는 동맥경화 및 심혈관계질환 발병의 위험인자로서 관심이 집중되고 있으며, 이들의 상관관계에 대한 세포 및 동물수준에서의 연구가 활발하게 진행되고 있다. 최근의 보고에 따르면, 산화적 스트레스는 동맥경화의 발병의 초기에 중심적 역할을 하는 것으로 규명되었고, 특히 NAD(P)H oxidase의 작용으로 생성되는 ROS에 의한 산화적 스트레스가 동맥경화 발병 및 진행의 초기 단계에 결정적 역할을 하는 것으로 알려지고 있다^{1, 2)}.

한편 cytochrome P450 (CYP)은 외부 독성물질에 대한 대사 체계에 관련된 효소계로서 정상적인 발현 수준에서는 유해 물질 (genobiotics)을 대사하여 안정적으로 배설하도록 작용 하는 것으로 알려져 있으나, 어떠한 경우 아직 알려지지 않은 요인에 의하여 지속적으로 과잉 발현된 CYP가 오히려 세포의 산화적 손상 (oxidative damage)을 야기하거나 촉진할 수 있다고 보고되었다³⁾. 또한 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)로서 유도한 CYP 1A1이 aryl hydrocarbon receptor (AHR)를 통한 동맥경화 유발에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되어있다⁴⁾.

名醫別錄에 최초로 수록된 大薊 (대계)는 性味が 甘苦凉하고 無毒하며, 心經과 肝經에 주로 작용하고, 養精·保血하는 藥性이 있어 出血性 질환 및 瘀血性 질환에 사용된다 하였다^{5, 9)}. 大薊과 관련한 실험연구로 저자 등은 고용량의 아세트아미노펜 투여로 유발된 마우스의 급성 산화적 간손상에 대한 大薊 약침액의 보호효과를 보고 하였으며, 실험동물의 간조직에서 과산화지질의 생성량 저해에 미치는 영향 및 항산화 효소계의 활성을 조절하는 역할¹⁰⁾을 중심으로 검토 하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 진행된 다음 연구에서는 in vitro에서 大薊 약침액의 활성산소 소거능 및 hydroxyl radical에 의한 DNA 분절에 대한 방어효과를 보고¹¹⁾ 하였다. 또한 大薊 약침액의 지질과산화 억제효과 및 CYP 효소 활성 조절 효능을 측정하여 논문으로 발표¹²⁾ 하였다. 하지만 이러한 大薊 약침액의 다양한 생리적 활성에 비하여, 아직 大薊을 전초를 대상으로 열수 추출물에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 이번 연구에서는 大薊을 열수로 추출하고, 산화적 스트레스에 의한 동맥경화 발생의 초기 치료제로서의 개발 가능성을 평가하기 위한 실험을 구상 하였다. 특히, 심혈관계질환에 관련한 생화학적 표식

자 (bio-marker)로서 ROS 소거효과 및 CYP 활성 저해효과를 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 약재 및 열수추출물의 제조

본 실험에 사용한 大薊은 동국대학교 한방병원 (경북 경주시)에서 구입한 것을 정선하였으며, 건조된 大薊의 쏘를 작은 크기로 잘라 시료 추출에 사용하였다. 大薊 열수추출물 (Circium japonicum Water Extracted Solution, CJWS)을 제조하기 위한 과정으로 먼저 60 g의 약재에 500 mL의 증류수를 가하여 3 시간 동안 전탕 추출하였으며, 여기서 얻은 추출물을 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 침전물을 제거 하였다. 회수된 상등액을 여과지 (No.#1, Whatman[®], Germany)로 여별하고, 여액은 rotary evaporator (N-1000, EYELA, Japan)에서 최종 부피가 50mL가 될 때까지 농축하였다. 농축액은 동결건조 (Freezon[®], LABCONCO, USA) 과정을 거쳐, 최종 10.41 g (회수율 17.35%)의 분말을 회수하였다. 회수된 분말은 실험에 사용하기 전까지 냉동 건조한 환경에서 보관하였으며, voucher specimen은 동국대학교 한의과대학 경혈학교실에 보관되어 있다

2. 재료 및 동물

이번 연구에 사용한 시약으로 L-ascorbic acid (vitamin C), deoxyribose, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ferric chloride (FeCl₃), hydrochloride (HCl), hydrogen peroxide (H₂O₂), hypoxanthine, nitro blue tetrazolium (NBT), trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), xanthine oxidase는 Sigma社 (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였고, 그 외에 사용한 시약들은 모두 Merck社 (Merck KGaA, Germany) 및 Junsei社 (Junsei Chemical Co. Ltd. Japan)의 특급 제품을 구입하여 사용하였다. 본 실험의 모든 plastics 제품은 Falcon社 (Falcon Labware, Franklin Lakes, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 간조직 균질액을 조제하기 위한 실험동물은 4~5주령 경과한 웅성의 Sprague-Dawley rats을 Orient Bio (경기도 성남시)에서 공급받아, 항온항습 조건 (온도: 24±2°C, 습도:

60%)에서 2 주 동안 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 적응 기간 동안 사료 및 물은 자유로이 먹게 하였다.

3. DPPH radical 소거능 측정

CJWS의 DPPH radical에 대한 소거 활성은 Gyamfi 등의 방법¹³⁾을 따라 실시하였다. 먼저 다양한 농도의 CJWS를 50 μ L의 증류수에 녹이고, 이것을 0.1 mM DPPH-ethanol solution 1 mL와 450 μ L의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)가 포함된 mixture에 넣어 잘 흔들어 교반 시켰다. 반응 용액을 실온에서 30 분간 배양한 후 흡광도 517 nm에서 CJWS에 의한 DPPH radical의 소거능을 측정 (Optizen 2120 UV, MECASYS, Korea)하였으며, 본 실험의 양성대조군은 CJWS와 동일한 농도의 L-ascorbic acid를 처리하였다.

4. Superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$) 소거능 측정

Superoxide radical에 대한 소거능 측정은 Gotoh 등의 방법¹⁴⁾을 일부 수정하여 실행하였다. 농도별 CJWS를 100 μ L의 30 mM EDTA (pH 7.4), 50 mM의 NaOH에 녹인 10 μ L의 30 mM hypoxanthine, 그리고 200 μ L의 1.42 mM NBT가 포함된 반응용액에 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 3 분간 정치시킨 후 0.5 U/mL의 xanthine oxidase를 100 μ L 넣어 고르게 섞어주고, 50 mM의 phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 반응물의 최종 부피가 3 mL가 되도록 조정 하였다. 끝으로 실온에서 20 분간 반응을 유도하고, 흡광도 560 nm에서 반응물에 의한 superoxide anions의 생성량을 측정하였다.

5. Hydroxyl radical ($\cdot OH$) 소거능 측정

CJWS가 hydroxyl radical을 직접소거하거나 간접적인 생성 억제력을 하는 정도를 측정하기 위하여 Halliwell 등의 방법¹⁵⁾을 따라서 deoxyribose assay를 실시하였다. 먼저 hydroxyl radical의 non-site-specific 소거능 분석 (직접 소거능)을 위하여 농도별 CJWS를 최종 농도가 0.1 mM $FeCl_3$, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM H_2O_2 , 2.5 mM deoxyribose 그리고 0.1 mM L-ascorbic acid으로 조성된 reaction buffer (pH 7.4)에 첨가하였다. 반응 용액을 37°C에서 1 시간 동안 배양 시킨 후 0.025 M NaOH에 녹인

0.5% TBA 1 mL과 2.8% TCA 1 mL 용액을 배양액에 섞어주고, 80°C 항온수조에서 30 분간 반응 시켰다. 실험의 종결 과정을 위해 시험관을 얼음에 보관하였으며, 흡광도 532 nm에서 deoxyribose degradation에 의한 hydroxyl radical의 소거능을 측정하였다. Chelate iron ions과 hydroxyl radical generation 사이의 간섭 능력을 측정하기 위한 site-specific 소거 활성 (간접 소거능)은 위의 non-site-specific 실험의 반응 용액 조성에서 EDTA를 제외하여 실시하였다.

6. Peroxynitrite ($ONOO^-$) 소거활성 측정

CJWS가 peroxynitrite를 소거하는 활성은 Crow의 방법¹⁶⁾을 따라 실시하였다. 먼저, 96 well microplate에 CJWS를 농도별로 분주하고, 90 mM NaCl과 5 mM KCl, 그리고 0.1 mM diethylenetriaminepenta acetic acid 및 10 μ M DHR 123을 함유하는 sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 반응 시켰다. 반응물에 의한 peroxynitrite의 생성량 측정은 96 well plate에 10 μ M ONOO를 더한 후 형광광도계 (SFM, Biotech, USA)를 이용하여 excitation 485 nm 및 emission 530 nm에서 측정을 측정하였다. 본 실험의 양성대조군으로는 penicillamine을 사용하였으며, CJWS와 동일한 농도에서 소거능을 비교 검토 하였다.

7. Nitric oxide (NO) 소거활성 측정

NO 특이적 표식자인 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)가 가지는 2 개의 아미노기 사이에서 포집된 NO를 측정하기 위한 방법으로 녹색 형광을 방출하는 생성물 (triazolofluorescein) 검출법을 이용하였다¹⁷⁾. 먼저 다양한 농도별 CJWS에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 400 배 희석한 1 mg의 DAF-2를 첨가하였다. 그리고 NO를 제공하는 물질인 SIN-1와 3.14 μ M의 DAF-2를 96 well plate에 첨가하였으며, 반응이 경과한지 10 분 후 excitation 485 nm 및 emission 530 nm에서 CJWS에 의한 NO의 생성 저해를 측정하였다.

8. $FeCl_2$ -ascorbic acid로 유도된 흰쥐 간조직의 지질과산화 억제효과 측정

$FeCl_2$ -ascorbic acid로 유도된 흰쥐 간조직 균질액

의 지질과산화에 대한 CJWS의 억제효과를 측정하기 위하여 Lin 등의 방법¹⁸⁾을 따라 실시하였다. 먼저 0.5 mL의 간조직 균질액을 0.1 mL의 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)과 0.05 mL의 0.1 mM ascorbic acid, 0.05 mL의 4 mM FeCl₂ 그리고 농도별 CJWS가 혼합하여 잘 섞어 주었다. 혼합물의 반응을 일으키기 위하여 37°C에서 1 시간 배양한 후, 0.9 mL의 증류수 및 2 mL의 0.6% TBA를 넣어주고 강하게 흔들어 혼합시켰다. 혼합물은 100°C 항온 수조에서 30 분 동안 열을 가하였고, 얼음에서 반응을 종결시키는 즉시 5 mL의 n-butanol을 첨가하여 섞어 주었다. 끝으로 1,000×g에서 10 분간 원심분리 하여 n-butanol 층을 얻었고, 수집된 supernatant는 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험에 사용된 간조직 균질액의 단백질 함량은 bicinchoninic protein kit (Sigma)을 사용하여 측정하였고, 양성대조군은 α-tocopherol을 사용하였다.

9. Cytochrome P450 2E1 활성 측정

Cytochrome P450 2E1의 활성 저해 정도를 측정하기 위하여 Christopher 등의 방법¹⁹⁾에 따라 p-nitrophenol에 의해 생성되는 p-nitrocatechol 측정법과 aniline hydroxylase 활성으로 인한 p-aminophenol 형성을 분석하는 두 가지 기질에 의한 반응으로 검토하였다. 먼저 높은 수준의 CYP 2E1을 강제 유발하기 위한 동물처치의 방법으로 pyrazole (200 mg/kg)을 4일간 실험용 쥐의 복강에 주사하고, 간조직을 적출하여 microsome을 얻었다¹²⁾. 각 실험에서 사용한 microsome은 최종 농도를 15 mg protein/mL로 조정하였다. 그리고 450 μM의 p-nitrophenol 혹은 10 mM의 aniline hydroxylase 기질을 시험관에 분주한 후 microsomal protein 및 NADPH-generating system (1 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate⁺, 9 mM glucose-6-phosphate dehydrogenase)을 첨가하여 교반하였다. 다음 과정으로 다양한 농도별 CJWS를 첨가하여, 37°C 항온 수조에서 20 분간 반응시켰다. 끝으로 0.5 mL의 0.6 N perchloric acid를 첨가하여 반응을 종료 하였으며, 16,000×g에서 2 분간 원심분리 하였다. 최종적으로 CYP 2E1의 함량을 측정하기 위하여, 혼합물의 상등액을 취하고 반응 기질의 종류에 따라 각각 10 N의 NaOH 0.1 mL (p-nitrocatechol 측정법) 또는 2.5 M NaOH에 희석된 5 %의 phenol 0.1 mL과 2.5 M sodium carbonate를 첨가

(p-aminophenol 측정법) 하고, 각각 흡광도 546 nm 또는 630 nm에서 분석 하였다. 본 실험에 사용한 양성대조군은 마늘의 추출 성분으로 알려진 diallyl sulfide (allyl sulfide)를 이용 하였다.

10. 통계 처리

실험의 결과는 평균값 및 표준편차 (mean±S.D.)로 표기하였으며, 각 실험은 세 번 이상 실시하여 실험 결과의 재현성을 검증 하였다. 결과의 통계적 유의성은 Student's *t*-test (Sigma Plot procedure, ver. 6.1 for Windows)를 사용하였으며, *p* 값이 0.05 이하인 경우에만 유의성을 인정하였다.

결 과

1. DPPH 및 Superoxide Radicals의 소거 효과

DPPH radical의 소거 활성을 측정한 결과, CJWS는 농도에 의존적인 소거활성을 나타내었다. 특히 본 실험에서 양성대조군으로 사용한 단일물질인 L-ascorbic acid와 비교하였을 때, 고농도 처리군인 8 mg/mL에서 양성대조군은 93%의 환원능을 보였으며, 동일 농도의 CJWS의 경우 56%의 소거효과를 보였다 (Figure 1A). 다음으로, xanthine oxidase와 hypoxanthine 사이에서 일어나는 반응을 통한 superoxide anions 생성을 억제시키는 정도를 측정한 결과 CJWS는 처리 농도에 의존하여 NBT의 환원을 나타내었으며, 4 및 8 mg/mL를 처리 하였을 때 각각 64% 및 66%의 높은 소거 활성을 나타내었다 (Figure 1B).

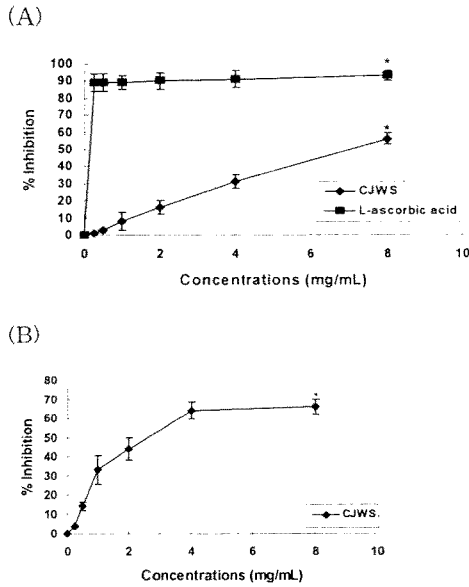


Figure 1. Radical scavenging activities of CJWS measured using the DPPH and superoxide anions using different assay systems. A) The direct scavenging activity of CJWS and ascorbic acid on DPPH radicals is expressed as the % inhibition. B) Superoxide anions scavenging activity of CJWS measured using NBT reduction. The CJWS was tested by monitoring NBT reduction caused by superoxide anions using the hypoxanthine-xanthine oxidase system. Data are the means \pm standard deviation (S.D.) of three independent experiments. * $p < 0.05$; indicated significant differences between experimental and control values.

2. Hydroxyl Radical 소거 효과

CJWS가 hydroxyl radical을 직접적으로 소거하는 능력을 알아보기 위하여 non-site-specific 활성을 측정된 결과 CJWS는 처리농도 4, 8, 그리고 10 mg/mL에서 각각 7%, 9%, 및 16%의 소거능을 나타내었다. 한편 CJWS가 metal ions를 chelating하여 hydroxyl radical의 생성을 막는 저해능을 평가 (site-specific) 하였을 때, CJWS는 농도에 의존하여 hydroxyl radical의 생성을 저해 하였으며, 특히 10 mg/mL의 고농도 처리군에서는 최고 56%에 달하는 강력한 저해 활성을 나타내었다 (Figure 2).

3. Peroxynitrite 및 Nitric Oxide의 소거 효과

CJWS를 농도별로 처리하여 in vitro에서 약물이

가지는 peroxynitrite 소거 활성을 평가하였을 때, CJWS는 농도에 의존적으로 ONOO를 강하게 억제하였다. 특히 ONOO를 특이적으로 저해하는 것으로 잘 알려진 양성대조군인 penicillamine과 비교하였을 때, CJWS는 저농도 에서부터 고농도 처리군 까지 유사한 저해 결과를 나타내었다 (Figure 3A). 한편 NO의 생성을 소거하는 효과를 측정할 경우, CJWS 처리 저농도 (0.5 및 5 $\mu\text{g/mL}$)에서는 소거 활성을 나타내지 않았으나, 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 처리 농도에서는 최고 92%까지 소거를 보였다 (Figure 3B).

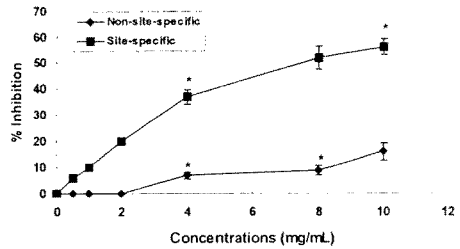


Figure 2. Scavenging activity of CJWS on hydroxyl radical-mediated deoxyribose degradation. Hydroxyl radicals were generated by Fenton's reaction using a deoxyribose assay system, and the non-site-specific and site-specific scavenging activities of hydroxyl radicals by CJWS are expressed as the % inhibition. Each values represents the mean \pm S.D. of triplicate experiments. * $p < 0.05$; indicated significant differences between experimental and control values.

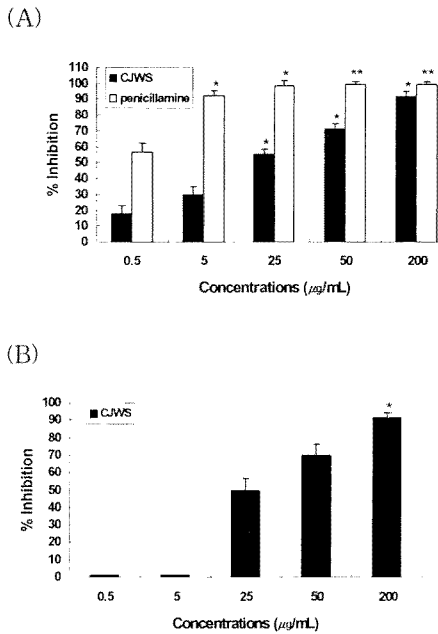


Figure 3. Inhibitory effects of CJWS on DCDHIF-mediated peroxynitrite and nitric oxide. A) Inhibitory effects of CJWS and penicillamine on peroxynitrite radicals is expressed as the % inhibition. B) Inhibitory effects of CJWS on nitric oxide-synthase is expressed as the % inhibition. Experimental details are described in the Materials and Methods section. Data are the means \pm S.D. of three independent experiments. * p <0.05; ** p <0.01; indicated significant differences between experimental and control values.

4. 지질과산화 억제효과 측정

FeCl₂와 ascorbic acid로 유도한 흰쥐 간조직 균질액의 지질과산화를 억제하는 효과를 CJWS를 처리하여 측정한 결과 5 및 50 µg/mL에서 각각 60%에서 67%에 이르는 억제 효능을 나타내었다. 한편 본 실험에서 양성대조군으로 사용한 α -tocopherol을 CJWS와 동일한 용량으로 처리하였을 때 40%에서 75%에 달하는 억제 효과를 보였다 (Figure 4).

5. Cytochrome P450 2E1 활성에 대한 효능

CJWS가 CYP 2E1을 저해하는 정도를 평가하기 위한 실험으로 p-nitrophenol 및 aniline hydroxylase를 측정하였다. 먼저 반응 기질인 p-nitrophenol을 첨가하여 CYP 2E1을 매개화하는 p-nitrocatechol의 생

성 저해를 측정하였을 때 CJWS는 처리 농도에 따라 1 및 10 µg/mL에서 27% 그리고 55%의 저해 효능을 나타내었다 (Figure 5A). 다음으로, aniline hydroxylase의 방법으로 측정한 결과에서는 CJWS는 10 µg/mL에서 47%의 저해 활성이 관찰 되었다 (Figure 5B).

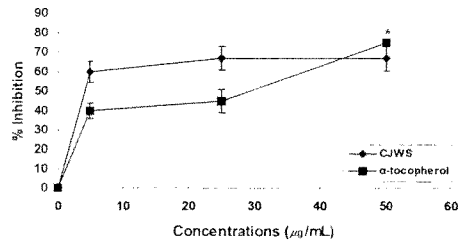


Figure 4. Inhibitory effects of CJWS and α -tocopherol on MDA production in rat liver homogenate induced by FeCl₂-ascorbic acid in vitro. The results are presented as mean \pm S.D. of triplicate experiments. * p <0.05; indicated significant differences between experimental and control values.

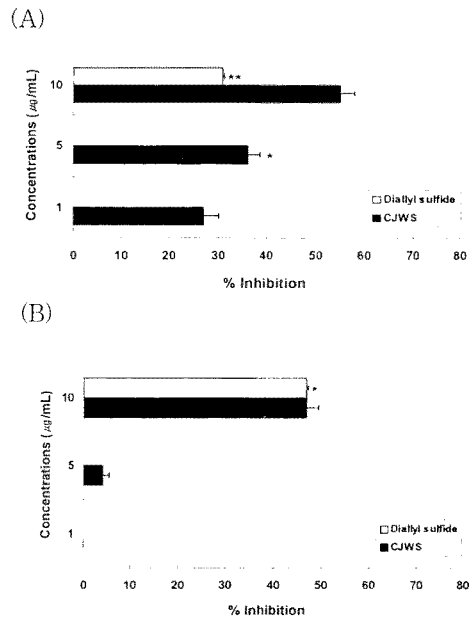


Figure 5. Inhibitory effects of CJWS and diallyl sulfide on cytochrome P450 2E1. The inhibitory effects of cytochrome P450 2E1 using different substrates-mediation A) p-nitrophenol and B) aniline hydroxylase activities in rat liver microsomes derived from pyrazole injection. The concentration of CJWS samples tested injection ranged from 1 to 10 µg/mL. Experimental details are described in the Materials and Methods section. The results are the means of three separate experiments. * p < 0.05; ** p <0.01; compared with the control group.

고 찰

大薊은 엉겅퀴라는 이름으로 잘 알려져 있는 국화과에 속하는 식물의 쏜초로서, 우리나라에서 흔히 자생하는 것으로 알려진 풍부한 자원이 보장되는 약재이다. 본 약물은 名醫別錄의 中品에 최초로 수록되었으며 養精·保血하고, 肥建하는 기능이 있고, 心經과 肝經으로 작용하며, 임상에서는 出血, 瘀血 및 炎症과 관련한 消化器, 婦人科, 外科 및 泌尿生殖器 疾患에 주로 사용되어 涼血止血의 효능이 탁월한 것으로 알려져 있다⁵⁻⁹⁾.

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 생체 내에서 다양한 대사 경로를 거쳐 생성되며, 적정량의 ROS가 존재할 경우 생체의 생리기능을 유지하는 신호로 작용하지만, 만일 과잉 생성 되었을 경우 위험 수준의 산화적 스트레스를 유발한다. 특히 동맥경화와 관련하여 NAD(P)H oxidase나 xanthine oxidase의 작용에 의해 생성되는 세포 내 초기 radicals 형태인 superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)과 같은 활성산소종은 혈관평활근의 이주와 증식을 촉진함으로써 동맥경화를 촉진 한다²⁰⁾. 한편, 동맥경화의 초기 단계에서 발견되는 특징적·가시적인 병변으로 'fatty streaks'의 진행이 가장 결정적인 증거가 될 수 있다. 이는 인간과 동물을 대상으로 한 연구결과에서 증명되었으며, 'fatty streaks'가 형성되기 위해서는 활성산소종에 의하여 생성된 oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL)이 혈관내피를 지나서 혈관벽속으로 이동하는 것이 필수적이다²¹⁾. 따라서 활성산소종은 지질의 변형과 Ox-LDL을 생성시킴으로써 동맥경화 발병의 초기에 결정적 역할을 담당하거나 동맥경화의 진행을 촉진 하는 것으로 알려져 있다²²⁾.

본 연구에서는 CJWS가 산화적 스트레스에 의한 동맥경화 예방 및 치료제로서 개발 가능성을 평가하기 위해 산화적 스트레스를 유발인자인 활성산소종의 소거능 및 지질과산화 반응에 억제 효능을 검토하였다. 먼저 자유기 소거능을 평가하기 위한 방법으로 DPPH radical에 대한 소거를 검토한 결과 CJWS 농도에 의존하는 DPPH 소거 활성을 나타내었다. 특히 최고 농도를 처리한 실험군에서는 56%의 소거효과를 보였으며 (Figure 1A), 이러한 결과에서 CJWS는 불안정한 자유기나 활성산소에 대해 전자를 공여하여 안정화시키는 역할을 하는 것으로 판단되었다. 다음으로, 본 실험에서는 CJWS가 동맥경화 발병 초기의 주요 위험인자인 superoxide anions를 소거하는 효능을 검토하였다. 결과를 살펴보면, xanthine oxidase와

hypoxanthine의 반응에 의해 생성된 superoxide anions이 CJWS의 처리에 의존하여 최고 66% 정도의 소거되었으므로 (Fig. 1B) CJWS는 동맥경화 발병 초기에 관여하는 주요 활성산소종을 소거하는 것으로 판단되었다. 따라서 본 약물이 향후 동맥경화 예방 및 진행억제의 목적으로 개발될 수 있는 가능성이 있음을 시사하였으며, 궁극적으로는 활성산소종에 의한 연쇄적인 지질과산화 반응과 이로 인한 산화적 스트레스를 미연에 차단할 수 있을 것으로 기대 할 수가 있었다.

한편 superoxide anion 사이의 비특이적 결합으로 인하여 생성되는 hydroxyl radicals에 대한 소거 효능을 CJWS를 대상으로 검토하였을 때, CJWS는 non-site-specific 및 site-specific 모두에서 소거 활성을 보였다. 또한 CJWS는 이미 생성된 hydroxyl radical을 직접적으로 소거하는 활성에 비하여 metal ions를 chelating함으로써 hydroxyl radical이 생성되는 과정을 차단하는 효과가 더 우수한 것으로 관찰되었다 (Figure 2).

이상의 실험을 통하여, free-radicals 및 ROS에 대한 大薊 추출물의 억제 또는 차단 효능을 규명한 결과, CJWS는 DPPH radical을 소거하였을 뿐만 아니라, 동맥경화 발병 초기에 산화적 스트레스의 주된 위험 인자로 작용하는 superoxide anion을 강력하게 억제 하였다. 또한 생체 내에서 작용하였을 때 보다 강한 활성을 가지는 것으로 알려진 hydroxyl radical에 대해서도 생성 억제 효능을 보였다. 이러한 CJWS의 높은 ROS 소거능을 바탕으로, 다음 실험에서는 ROS의 대사 경로에서 최종 생성 radicals이라고 할 수 있는 peroxynitrite 및 nitric oxide의 제어 능력을 in vitro에서 측정 하였다. Peroxynitrite 및 nitric oxide는 혈관내피 세포에서 다양한 대사 경로를 통하여 생성되는 것으로 알려져 있으며, nitrogen dioxide radicals 등과 관련하여 세포 내 손상을 가하는 것으로 밝혀졌다²³⁾. 따라서 이러한 종류의 ROS를 제거하는 것은 혈관내피 세포의 손상을 방지 하는데 매우 효과적이라고 판단되며, 본 실험에서 CJWS는 peroxynitrite의 경우 농도에 의존적으로 92%까지 소거 하였으며 (Figure 3A), nitric oxide를 강력하게 제거 하였다 (Figure 3B).

다음으로 실제 실험동물의 간조직 균질액을 대상으로 지질과산화 (lipid peroxidation, LPO)를 억제할 수 있는가를 검토하기 위하여, 본 실험에서는 흰쥐의 간조직 균질액에 $FeCl_2$ -ascorbic acid로 인위적 LPO를 유도한 후 농도별 CJWS를 처리하였다. 그 결과,

CJWS 처리군에서 최고 67%의 억제효능을 보였으며, 이는 기존의 항산화제인 α -tocopherol과 비교하였을 때 유사한 수준이었다 (Figure 4).

끝으로 CJWS를 대상으로 CYP 2E1의 활성을 억제하는 정도를 평가한 결과, CJWS는 알콜 의존성 과잉발현 CYP 2E1을 방어하거나 제어하는 효능이 우수함을 알 수 있었다 (Figure 5A, 5B). 하지만, 동맥경화 유발과 직접적으로 관련이 있다고 알려진 CYP 1A1 및 1A2의 활성에는 in vitro에서 미흡한 저해효과를 나타내었다 (data not shown).

결론

CJWS는 DPPH 및 superoxide radicals을 효과적으로 소거하였으며, hydroxyl radical에 대해서도 강력한 생성 저해 효과를 나타내었다. 또한 in vitro 실험에서 peroxynitrite와 nitric oxide를 매우 강하게 억제하였다. 그리고 CJWS는 FeCl_2 -ascorbic acid에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 방어 하였으며, CYP 2E1의 활성을 처리 농도에 의존하여 저해함을 관찰할 수가 있었다. 따라서 본 연구의 결과를 바탕으로 大薊가 동맥경화 초기에 주요 원인으로 작용하는 산화적 스트레스를 효과적으로 방어함으로써 향후 동맥경화의 예방 및 치료를 위한 후보물질의 발굴과 개발에 있어서 유용한 약물로 평가된다.

감사의 글

“이 논문은 동국대학교 학술지원 사업비 및 2005년도 정부 (과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원으로 수행되었음 (No. R13-2005-013-01000-0).”

참고문헌

- Hur ES, Lee KH. Cardiovascular disease and natural antioxidants. *Journal of Human Ecology*. 2001;5:19-35.
- Diane LT. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: Emphasis on vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Circulation*. 1999;99:591-5.
- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haparanta T, Mayer RT. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a

series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol*. 1985;34:3337-45.

4. Iwano S, Asanuma F, Nukaya M, Saito T, Kamataki T. CYP1A1-mediated mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *BBRC*. 2005;337:708-12.

5. 陶弘景. 名醫別錄. 北京:人民衛生出版社. 1986:154-5.

6. 范催生. 中藥采收鑑別應用全書. 南昌:江西科學技術出版社. 1995:594-5.

7. 顏正華. 中藥學. 北京:人民衛生出版社. 1991:458-60.

8. 中華人民共和國衛生部藥典委員會. 中華人民共和國藥典. 北京:人民衛生出版社. 1985:17.

9. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:法仁文化社. 1999:1942.

10. Lee JJ, Moon JY. Effects of Circii Herba aqua-acupuncture (BL18, CV12) on acute oxidative liver injury. *The Korean Journal of Meridian & Acupoint*. 2003;20(4):41-52.

11. Lee JJ, Moon JY. Antioxidant property of aqua-acupuncture solution from Circium japonicum. *The Korean Journal of Meridian & Acupoint*. 2005;22(4):57-65.

12. Lee JJ, Kim H, Yi HS, Park WH, Moon JY. Suppression of lipid peroxidation and CYP isozymes activities by Circium japonicum herbal-acupuncture solution: Basic study for screening of medicinal herb on reactive oxygen radical and CYP-mediated atherosclerosis. *The Korean Journal of Meridian & Acupoint*. 2006;23(4):177-86.

13. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. *Gen. Pharmacol*. 1999;32:661-7.

14. Gotoh N, Niki E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochem. Biophys. Acta*. 1992;1115: 201-7.

15. Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem*. 1987;165:215-9.

16. 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;1:145-57.

17. Sutherland H, Khundkar R, Zolle O, McArdle A, Simpson AW, Jarvis JC, Salmons S. A fluorescence-based method for measuring nitric oxide in extracts of skeletal muscle. Nitric Oxide. 2001;5:475-81.

18. Lin CC, Wu SJ, Chang CH, Ng LT. Antioxidant activity of Cinnamomum cassia. Phytother. Res. 2003;17:726-30.

19. Christopher JS, Christopher DW, John RB. Differential in vivo effects of α -naphthoflavone and β -naphthoflavone on CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver, lung, heart and kidney. J Biochem Molecular Toxicology. 1999;13:29-40.

20. Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Lassegue B, Griending KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007;27:Article in press.

21. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular Disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005;25:29-38.

22. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. Thrombosis and Haemostasis. 2004;3:254-67.

23. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. Cardiovascular Res. 2005;68:26-36.