

쇄양의 항산화 및 항염증 효과

김경애 · 이효승 · 윤현정 · 박선동*

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Fractionated Extracts of *Cynomorium Songaricum*

Kyung Ae Kim, Hyo Seung Yi, Hyun Jeong Yun, Sun Dong Park*

Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Oxidative stress and inflammation are important events in the development of chronic inflammatory diseases including arthritis, atherosclerosis, diabetes, hypertension. *Cynomorium songaricum* (CS) has been used as a traditional Korean herbal medicine, and it is currently used in traditional clinics to treat frequent urination, spermatorrhea, weakness of the sinews and constipation in the folk medicine. The aim of this study was to determine whether fractionated extracts of CS inhibit free radical generation such as DPPH radical, superoxide radical, nitric oxide and peroxynitrite, production of nitrite an index of NO, PGE₂, iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 macrophages. Cytotoxic activity of extracts on RAW 264.7 cells was measured using 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. Our results indicated that the most superior extract which scavenged DPPH radical, reactive oxygen species (ROS) and RNS was CS ethyl acetate extract (CSEA). Moreover, CSEA significantly inhibited the LPS-induced NO, PGE₂ production and iNOS, COX-2 expression accompanied by an attenuation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 formation in macrophages. Furthermore, CSEA treatment also blocked LPS-induced intracellular ROS production and the activation of NF- κ B. These findings indicate that CSEA inhibits the production of pro-inflammatory mediators and cytokines via the suppression of ROS production and NF- κ B activation. Take together, these results indicate that CSEA has the potential for use as a natural anti-oxidant and an agent of anti-chronic inflammatory diseases.

Key words : *Cynomorium songaricum*(CS), RAW 264.7, anti-oxidant, anti-chronic inflammatory diseases

서 론

대기의 약 20%를 차지하는 산소는 호기적 대사를 하고 있는 생물체에서 필수 불가결한 요소이다. 하지만 세포로 흡수된 산소의 1-4%는 전자 전달과정에서 완전히 환원되지 못하고 free radical로 전이되어 다양한 세포독성을 나타내게 된다. 인체 내에는 이러한 free radical을 제거하는 산화억제 기구가 활성화되어 있어서 산화촉진물질과 산화억제물질이 균형을 이루고 있지만 여러 가지 요인들에 의하여 이 균형상태가 깨져서 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포 손상 및 병리적 질환이 야기된다¹⁾. 산화적 스

트레스는 내부적으로는 염증 (inflammation), 자가면역반응 (autoimmune reactions), 대사장애 (dysregulation of metabolism), 허혈 (ischemia) 등에 의해서, 외부적으로는 미생물 (microbiological organism), 전자기 조사 (electromagnetic radiation), 기계적이나 화학적인 자극 등에 의해서 유발될 수 있고, 이는 인체의 모든 기관과 세포에 영향을 줘서 궁극적으로 산화적 손상 (oxidative damage)를 초래하게 된다. 따라서 산화적 손상이라는 것은 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)와 활성 질소종 (reactive nitrogen species, RNS)의 생성과 이것들을 방어하는 능력 간의 불균형의 연속이라고 정의할 수 있다²⁾.

산화적 손상에 관여하는 대표적인 ROS와 RNS에는 superoxide (O₂⁻), nitric oxide (NO), hydroxyl ion (OH) 등의 free radical이 있고, 그 외에 산소 유래종 (oxygen-derived species)인 singlet oxygen (¹O₂), hydrogen peroxide (H₂O₂),

* 교신저자 : 박선동, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학

· E-mail : sundong@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2654

· 접수 : 2009/10/26 · 수정 : 2009/11/15 · 채택 : 2009/12/01

hypochlorous acid (HOCl) 등도 있는데, 이들의 생성은 대부분 체내에서 기원한다³⁾. 세포 내에 존재하는 미토콘드리아, peroxisome, xanthine oxidase (XOD), NADPH oxidase 및 cyclooxygenase (COX) 등의 효소들은 지속적으로 ROS를 생성하고, RNS는 염증반응 시 대식세포, 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성되며, 이때 ROS도 같이 생성된다^{4,5)}. 생체 내 복구체계의 증강 및 손상을 감소시키기 위한 일련의 활성화기전이며, 모든 조직에서 잘 유지되는 염증반응은 대단히 복잡한 기전으로 조절되고 있는 것으로 알려져 있다. 중요한 것은 반복되는 조직의 손상이나 재생에 의해 염증반응이 지속되면, 염증관련 세포에서 ROS와 RNS가 과다 생성되고, 그 결과 영구적인 유전자의 변형이 야기되어 병태가 유발된다는 것이다⁶⁾. 이처럼 ROS와 RNS는 염증반응과 아주 깊은 관련이 있다.

조직의 손상이나 감염성 병원체의 침입 등으로부터 인체를 보호하기 위해 일어나는 급성 염증 반응은 아주 유익하고 중요한 면역 반응이지만, 이 염증 반응이 만성화되면 류마티스 관절염, 동맥경화증, 위염, 천식 등의 염증성 질환을 유발할 수 있다⁷⁾. 염증의 발병은 cytokine 네트워크와 다양한 염증인자 (pro-inflammatory mediator)들의 유발 등에 의해서 조절되는 복합적인 과정을 통해서 일어나게 된다. Nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 많은 염증성 질환을 일으키는 병인으로 주목받고 있는데, inducible nitric oxide synthase (iNOS) 와 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 염증인자를 전사시키는데 있어서 중요한 역할을 한다⁸⁾. iNOS와 COX-2는 nitric oxide (NO) 와 prostaglandins (PGs)라는 또 다른 염증인자를 생성시키는 것으로 잘 알려져 있는데, iNOS의 경우 L-arginine의 산화적 탈아미노화 (deamination)를 자극해서 강력한 염증인자인 NO를 생성시킨다⁹⁾. iNOS에 의해서 생성된 NO는 면역반응에서 유용한 역할을 하지만, 지속적인 NO의 생성은 만성 염증 질환을 일으키는 중요한 요인이 된다. COX-2는 PGs의 생합성을 자극함으로써 염증 반응의 조절에 중요한 역할을 하는 효소이다. COX-1이 거의 모든 조직에 발현되어 있고 신장의 혈액 흐름을 조절하거나 위장의 세포를 보호하는 등의 생리적 기능을 조절하는 역할을 하는 반면, COX-2는 정상상태에서는 거의 발현되어 있지 않다가, 염증인자나 cytokine, endotoxin, 종양형성유전자와 같은 mitogen 자극에 의해서 빠른 속도로 발현된다.

세포 내의 ROS 생성 역시 염증 반응에서 중요한 인자이다. ROS는 세포손상의 매개자이고, 내독소 혈증 (endotoxemia) 중에 세포손상을 유발시키는데 관여한다¹⁰⁾. ROS는 다양한 세포 스트레스 매커니즘에 관여하고 있고, 세포의 산화환원성 (redox status)이 NF-κB의 활성을 조절한다는 보고도 있다. 실제로 뛰어난 항산화 물질이 NF-κB의 활성을 억제하고^{11,12)}, 세포 내의 ROS 생성을 감소시킨다는¹³⁾ 연구 결과는 아주 많이 보고 되어있다.

대식세포는 신체 내에 널리 분포되어 있는 세포로 외부 병원체가 침입했을 경우에 백혈구의 이주 (migration)보다 빠른 즉시형 반응을 보임으로써 면역, 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 박테리아성 내독소인 Lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포에서 iNOS, COX-2, tumor necrosis factor-α (TNF-α), 세포

내 ROS, 그리고 다양한 interleukin (IL)들과 같은 염증인자의 생성을 촉진시킨다^{14,15)}. 따라서 LPS에 의해서 생성되는 염증인자들을 억제하는 물질은 대식세포의 활성화와 연관된 다양한 염증 질환들의 치료에 유용하게 쓰일 수 있다고 간주되고 있으며, 대식세포주 중에서도 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포는 LPS의 자극에 반응하여 아주 효과적으로 염증인자들이 생성되기 때문에 유용한 항염증 물질을 찾는 선별 검사에서 다용되고 있다.

최근 합성 항산화제의 부작용들이 밝혀지면서 천연자원으로부터 항산화제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있고, 천연 자원에서 얻어진 항산화 물질들이 뛰어난 항염증 작용도 수반하고 있다고 알려진 경우도 많다¹⁶⁻¹⁸⁾. 류마티스 관절염, 동맥경화증, 위염, 천식, 당뇨 등은 대표적인 만성 염증성 질환으로 현재 임상에서 이러한 질환이 차지하는 비중은 실로 막대하다. 한방에서는 오랜 역사에 걸쳐서 다양한 천연 자원을 치료제로서 이용해 왔다. 그러므로 항산화 및 항염증 효과를 지닌 천연물을 찾아서, 만성 염증성 질환에 사용할 수 있는 치료물질로 개발하는데, 크게 이바지할 수 있을 것이다.

鎖陽은 쇄양과의 여러해살이 기생성 육질 식물 쇄양 *Cynomorium songaricum* Rupr. (CS)의 육질 줄기로서, 봄과 가을에 채집하여 花序를 제거하고 晒乾하여 사용한다¹⁹⁾. 한의학적으로 볼 때, 쇄양의 藥性은 甘溫하고, 腎, 大腸, 肝經으로 歸經하며, 補腎壯陽, 潤腸通便하는 효능으로 인하여 陽痿, 遺精, 遺尿, 便秘 등을 치료하는데 사용되어 왔다²⁰⁾. 쇄양의 약리작용 관련하여 위장운동과 장관운동을 촉진하여 通便을 시키는 작용, 면역력 증진, 항 혈소판 응집 작용²¹⁾, 생식능력 증강 작용^{22,23)}, 골다골증 유발 마우스의 골밀도 향상 작용²⁴⁾ 등이 보고되어 있고, 항산화와 관련되어서는 쇄양 열수 추출물의 DPPH radical 소거활성과 간세포의 산화방지 효과²⁵⁾와 ethyl acetate 추출물의 항산화 효과에 의한 신경세포 보호 효과²⁶⁾ 등이 보고되어 있다. 쇄양의 성분에서 관해서는 여러 종류의 steroid, triterpene, flavonoid와 lignan 등이 보고되어 있는데²⁷⁻²⁹⁾, 이 성분들 중에서 면역 증강 작용³⁰⁾, 항 만성 C형 간염 바이러스 효과³¹⁾ 등을 보이는 실험 결과가 보고 되어있다. 그러나 쇄양의 획분층별 추출물을 이용한 다양한 항산화 활성에 관한 연구 및 대식세포를 이용한 항염증 효과와 그 기전에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 쇄양을 메탄올 추출하고 그 추출물을 hexane (H), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA), butanol (B), 이렇게 네 가지 유기용매로 획분하여, 쇄양 메탄올 추출물 (CSM), 쇄양 H 추출물 (CSH), 쇄양 DCM 추출물 (CSDCM), 쇄양 EA 추출물 (CSEA), 쇄양 B 추출물 (CSB), 쇄양 aqueous 추출물 (CSA) 총 여섯 가지의 추출물을 얻었다. 이 여섯 가지 추출물 각각의 항산화 활성을 in vitro 상에서 비교한 다음, 그 중에서 뛰어난 활성을 지닌 획분층을 선택했다. 그리고 선택된 층은 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도시켜서, 약제가 이를 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는 지 관찰하였다. 그 지표로서 세포가 방출하는 NO, PGE₂ 생성량과 iNOS, COX-2 발현 정도와 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)인 TNF-α, IL-1β, IL-6 생

성 그리고 NF-κB 활성화와 세포 내의 ROS 생성량 등을 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 쇠양은 600 g에, 5000 ml의 100% methanol을 가한 다음 70°C에서 48시간 동안 추출하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 182.5 g의 메탄올 추출물 (수율 30.4%)을 얻었다. 이 메탄올 추출물은 Fig. 1에서와 같이 용매분획하였다.

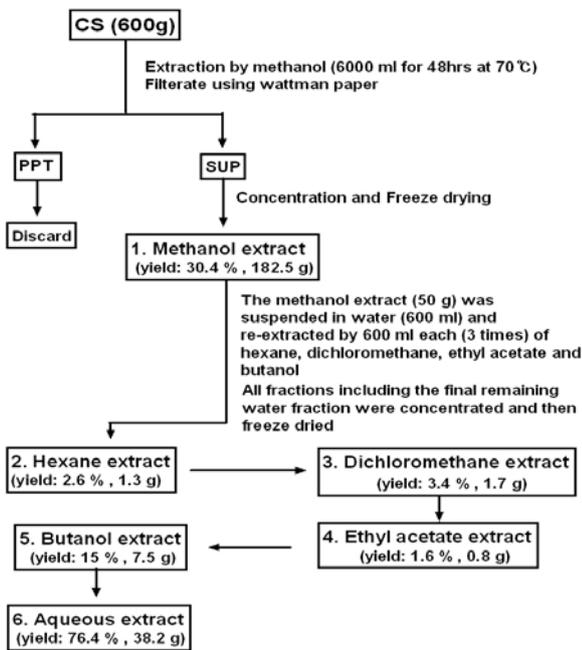


Fig. 1. Extraction and fractionation procedures of CS

2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Acrylamide, Bis는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였고, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, hydrogen peroxide (H₂O₂), hypoxanthine, nitro blue tetrazolium (NBT), xanthine oxidase, sodium nitroprusside (SNP), lipopolysaccharide (LPS), 4,5-diaminofluorecein (DAF-2), 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), CAPS, tween 20, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123)은 Molecular Probes사 (Eugene, USA)에서 구입하였고, Peroxynitrite는

Cayman Chemical사 (Ann Arbor, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 iNOS antibody와 2차 항체인 anti-rabbit and anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서, COX-2, p-IκBα, NF-κB와 β-actin antibody는 Cell Signaling Technology사 (Beverly, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega사 (Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정용 ELISA kit와 Nuclear and cytoplasmic protein extraction reagents는 Pierce Biotechnology사 (Rockford, USA)에서 구입하였으며, PGE2 assay kit는 R&D사 (Minneapolis, USA)에서 구입하였다. Protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) Free radical 소거활성 측정

(1) DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Gyamfi 등의 방법³²⁾에 따라 측정하였다. 먼저 쇠양 희분 증별 시료 50 μl에 0.1 mM DPPH 용액 1 ml과 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 450 μl를 가하여 잘 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 30분간 정지한 다음, micro plate reader (VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 파장 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical의 소거활성은 50%의 소거능을 보이는 농도 (IC50)로 표시하였다.

(2) Superoxide anions 소거활성 측정

Superoxide anions 소거활성은 Gotoh와 Niki의 방법³³⁾을 일부 수정하여 측정하였다. 먼저 희분 증별 시료 30 μl에 30 mM EDTA (pH 7.4) 100 μl, 30 mM hypoxanthine 10 μl, 1.42 mM NBT 200 μl를 가한 다음 실온에서 3분 반응시킨 후, 0.5 U/ml xanthine oxidase 100 μl를 첨가하고 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 총 용량을 3 ml로 맞췄다. 반응용액을 실온에서 20분간 배양시킨 후, 560 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 결과는 superoxide radical에 의한 NBT reduction의 IC50 값으로 환산하여 표시하였다.

(3) Nitric oxide 소거활성 측정

Nitric oxide의 소거활성은 Sutherland 등의 방법³⁴⁾에 의하여 측정하였다. 먼저 1 mg의 DAF-2를 0.55 ml의 DMSO에 용해시키고, 이를 다시 50 mM phosphate buffer를 사용하여 400배 (v/v)로 희석해서 DAF-2 용액을 준비해 놓았다. 희분 증별 시료 10 μl를 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 130 μl와 혼합한 다음, 40 mM SIN-1 10 μl 및 DAF-2 용액 50 μl를 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 10분간 배양한 다음, DAF-2와 NO의 반응에 의해 생성되는 triazolofluorescein의 형광강도를 fluorescence microplate reader (SPECTRA MAX GEMINI EM, Molecular Devices Corp., USA)를 사용하여, excitation 파장 495 nm 및 emission 파장 515 nm에서 측정하였다.

(4) Peroxynitrite 소거활성 측정

쇄양의 Peroxynitrite 소거활성은 Kooy 등의 방법³⁵⁾에 의하여 측정하였다. 희분 증별 시료 10 μ l를 4 μ l의 5 mM DTPA와 0.2 μ l의 5 mM DHR 123을 포함하고 있는 rhodamine buffer (50 mM sodium phosphate dibasic, 50 mM sodium phosphate monobasic, 90 mM sodium chloride and 5 mM potassium chloride)와 섞어준다. 반응은 10 μ M peroxynitrite를 10 μ l 넣으면서 시작되는데, 실온에서 10분간 배양한 다음, DHR 123과 peroxynitrite의 반응에 의해 생성되는 형광강도를 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 480 nm 및 emission 파장 530 nm에서 측정하였다.

2) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) MTS assay

쇄양 ethyl acetate (EA) 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법³⁶⁾으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1 \times 10⁴ cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약제를 농도별 (0, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 150, 200 μ g/ml)로 18 시간 동안 처리하였다. Well당 20 μ l의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도는 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교해서 보정하였다.

4) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System³⁷⁾을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 쇄양 EA 추출물을 전처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18 시간 배양하였다. 배양액 50 μ l와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 계산하였다.

5) PGE₂ 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE₂ 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 구입하여 실험하였다. 세포에 쇄양 EA 추출물을 전처리하고 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 PGE₂ 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 100 μ l씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50 μ l와 PGE₂ conjugate 50 μ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 μ l씩 처리하여 5-20분간 반

응시킨 후, 50 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS ; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 세척한 후, lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. Nuclear extract의 경우는 nuclear extraction kit를 사용하여 얻었다. 이후, 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비 특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체 (anti-iNOS, anti-COX2, anti-phospho I κ B α , NF- κ B)를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

7) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 세포에 쇄양 EA 추출물을 처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 μ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100 μ l의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100 μ l의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxy benzalmalonate (TMB) substrate를 100 μ l씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) DCF-DA assay

쇄양 EA 추출물이 H₂O₂와 LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA assay를 실시하였다^{38,39)}. 먼저 세포를 96 well plate에 1 \times 10⁴ cells/well로 분주하고, 약제를 농도별 (50, 100 μ g/ml)로 처리하고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거한 다음, PBS buffer로 희석된 10 μ M DCFH-DA를 가하고, 45분간 배양하였다. PBS buffer로 2회 washing한 다음 4 mM H₂O₂를 가하고, 30분 배양한 뒤에 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다. DCF 형광강도의 증가율은 대

조균과 비교해서 배수 (fold)로 계산하였다. LPS 처리군의 경우는 약재를 처리하고 1시간 배양 후에, 100 ng/ml의 LPS를 가한 다음, 18시간을 배양해서 DCF 형광강도를 측정하였다.

9) 통계처리

결과는 means±SEM으로 나타내었으며, 통계분석법은 GraphPad Prism 4.0을 이용하여 one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests를 실시한 후, P값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다. Western blot을 통해 얻은 band의 density 분석은 GelDoc-It BioImaging System (UVP, USA)을 사용하여 측정하였다.

결 과

1. 쇠양 획분층의 free radical 소거활성 측정

1) DPPH radical 소거활성 측정

쇠양의 메탄올 추출물과 그 획분층별 추출물 간의 전자 공여능을 비교하기 위하여, DPPH radical에 대한 소거활성을 측정하였다. 본 실험의 결과, 쇠양의 메탄올 추출물의 경우 73.0 µg/ml의 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였고, 획분층의 경우 hexane 층은 500.6 µg/ml, dichloromethane 층은 220.4 µg/ml, ethyl acetate 층은 9.6 µg/ml, butanol 층은 21.5 µg/ml 그리고 aqueous 층은 120.3 µg/ml의 농도에서 50%의 radical을 소거하였다(Fig. 2A). 따라서, 쇠양의 획분층 중에서 가장 우수한 전자공여능을 지닌 것은 ethyl acetate 층이라고 판단할 수 있었다.

2) Superoxide anions 소거활성 측정

대표적인 활성산소종 (reactive oxygen species)의 하나인, superoxide radical에 대한 소거활성의 경우에는, 메탄올 추출물의 경우 69.3 µg/ml의 농도에서 50%의 소거활성을 보였고, 획분층의 경우 hexane 층과 dichloromethane 층은 효과가 나타나지 않았고 (incalculable), ethyl acetate 층은 16.5 µg/ml, butanol 층은 20.3 µg/ml 그리고 aqueous 층은 104.5 µg/ml의 농도에서 50%의 소거능을 보였다(Fig. 2B). 본 실험의 결과, 쇠양의 획분층 중에서 가장 우수한 활성산소종 소거활성을 지닌 것은 DPPH radical 소거활성 실험결과와 같은, ethyl acetate 층임을 알 수 있었다.

3) Nitric oxide 소거활성 측정

활성질소종 (reactive nitrogen species)의 하나이며, 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 nitric oxide (NO)에 대한 쇠양 획분층의 소거효과를 in vitro 상에서 관찰하기 위하여, SNP를 사용하여 NO의 생성을 유도하고, 이로 인해 생성되는 DAF-2의 형광강도를 측정하였다. 그 결과, 메탄올 추출물의 경우 22.6 µg/ml의 농도에서, 획분층의 경우 hexane 층은 38.0 µg/ml, dichloromethane 층은 29.1 µg/ml, ethyl acetate 층은 2.0 µg/ml, butanol 층은 4.7 µg/ml 그리고 aqueous 층은 35.2 µg/ml의 농도에서 50%의 소거활성을 보였다(Fig. 2C). 따라서, 쇠양의 획분층 중에서 아주 우수한 NO 소거활성을 지닌 것은 ethyl acetate 층이라고 판단할 수 있었다.

4) Peroxynitrite 소거활성 측정

또 다른 활성질소종의 하나이며, superoxide radical과 NO의 결합으로 생성되는 peroxynitrite 에 대한 소거활성의 경우에는, 메탄올 추출물의 경우 36.2 µg/ml의 농도에서 50%의 소거활성을 보였고, 획분층의 경우 hexane 층은 129.6 µg/ml, dichloromethane 층은 49.5 µg/ml, ethyl acetate 층은 3.7 µg/ml, butanol 층은 5.2 µg/ml 그리고 aqueous 층은 47.4 µg/ml의 농도에서 50%의 소거능을 보였다(Fig. 2D). 따라서 ethyl acetate 층이 peroxynitrite 소거활성에서도 가장 우수한 효과를 보임을 알 수 있었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, DPPH radical, 활성산소종과 활성질소종 소거활성이 가장 뛰어난 층은 ethyl acetate 층이라는 결론을 내릴 수 있었고, 이어지는 마우스 대식세포를 사용한 실험은 ethyl acetate 층을 선별하여 진행하였다.

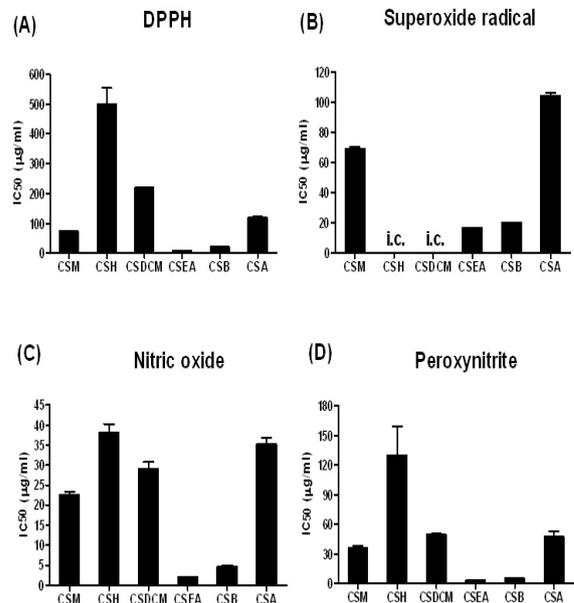


Fig. 2. Scavenging activities of fractionated CS extracts on various free radicals. The results are expressed as IC50 values, and each value represents the mean of three separate experiments. (A) Scavenging activity on DPPH radical. (B) Scavenging activity on Superoxide anions. (C) Scavenging activity on Nitric oxide. (D) Scavenging activity on Peroxynitrite. * i.c. means incalculable.

2. 쇠양 EA 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 약재의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 쇠양 EA 추출물을 농도별 (0, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 150, 200 µg/ml)로 18시간 동안 처리한 결과, 100 µg/ml의 농도까지는 세포의 생존율이 90% 이상으로 독성이 나타나지 않았지만, 그 이상의 농도에서는 세포의 생존율을 10% 이상 감소시켰다(Fig. 3). 그래서 쇠양의 추출물이 RAW 264.7의 세포 생존율에 영향을 주지 않는 100 µg/ml 이하의 농도로 다음 실험을 진행하였다. 이는 쇠양 추출물이 보여주는 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 고유한 특성을 말한다.

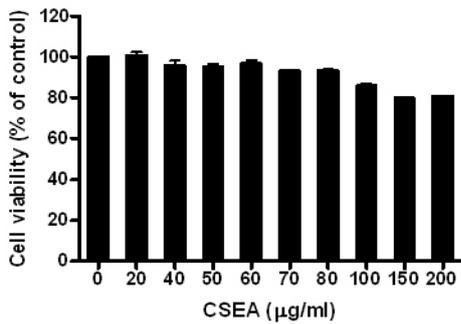


Fig. 3. Effect of CSEA extracts on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 150, 200 µg/ml) of CSEA extracts for 18 hr. Cell viability was measured by MTS assay as described in Materials and Methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

3. RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성에 미치는 영향

쇄양 EA 추출물이 H₂O₂와 LPS에 의한 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성에 미치는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 검토하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 50, 100 µg/ml의 EA 추출물을 전처리한 다음, H₂O₂와 LPS로 세포 내의 ROS 생성을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여, H₂O₂와 LPS를 단독 처리한 실험군에서는 유의성 있는 형광강도의 증가를 보였다. 이로써 H₂O₂와 LPS의 처리가 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. H₂O₂ 단독 처리군의 경우, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여 4.6배 정도로 형광강도가 증가한 반면, 50 µg/ml과 100 µg/ml의 쇄양 EA 추출물 처리군은 각각 2.5배, 2.0배 증가하여 효과적 (각각 44.5, 56.4%)으로 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 4A). 그리고 LPS 단독 처리군의 경우, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여 5.7배 정도로 형광강도가 증가한 반면, 50 µg/ml과 100 µg/ml의 쇄양 EA 추출물 처리군은 각각 2.7배, 1.9배 증가하여 역시 효과적 (각각 52.1, 66.8%)인 세포 내 ROS 생성 억제능을 보였다(Fig. 4B). 약제만의 단독 처리가 세포 내 ROS 생성에 영향을 주지 않음도 확인되었다.

4. RAW 264.7 세포에서 NO와 PGE₂의 생성량에 미치는 영향

먼저 염증 유발 물질로 주로 사용되는 LPS를 사용하여 염증 유발에 필요한 적절한 농도를 조사하였다. RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별 (0, 1, 10, 100 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 후 Griess Reagent를 사용하여 조사한 결과 NO의 생성량이 농도 의존적으로 증가되었으며, 100 ng/ml의 농도에서 가장 효과가 있었다. 또한, PGE₂의 생성량을 ELISA 방법을 이용하여 조사한 결과 LPS의 농도별로 증가하였고, 100 ng/ml의 농도에서 역시 가장 우수한 효과를 보였다 (data not shown). 약제의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 EA 추출물 50, 100 µg/ml을 1시간 동안 전처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성량에 미치는 영향을 같은 방법으로 조사한 결과, 50 µg/ml에서는 50.1%, 100 µg/ml에서는 89.9% 감소시켰다(Fig. 5A). 또 LPS에 의해 유도되는 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 50 µg/ml에서는

26.7%, 100 µg/ml에서는 47.9% 감소시켰다(Fig. 5B). 따라서 쇄양 EA 추출물은 LPS로 유도된 NO와 PGE₂의 생성을 농도 의존적으로 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

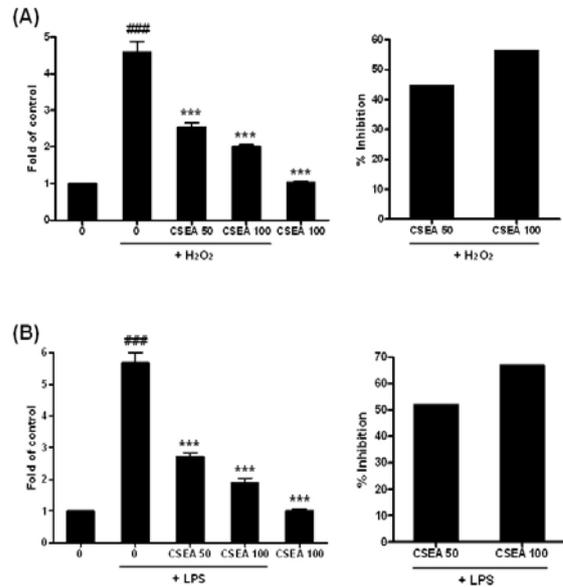


Fig. 4. Inhibitory effect of CSEA extracts on intracellular ROS production in RAW 264.7 induced by LPS and H₂O₂. RAW 264.7 cells were preincubated with 50, 100 µg/ml of EA extracts for 18 hr. 100 ng/ml of LPS and 4 mM H₂O₂ were treated to induce intracellular ROS production. The increase of DCF fluorescence was calculated at increasing fold of control. (A) Effect of EA extracts on intracellular ROS production induced by H₂O₂. (B) Effect of EA extracts on intracellular ROS production induced by LPS. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or LPS · H₂O₂ alone (*); ### : P < 0.001.

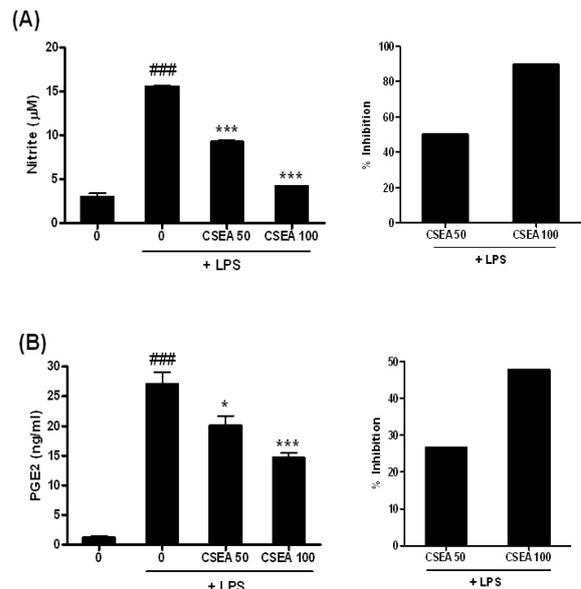


Fig. 5. Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by CSEA extracts. RAW 264.7 cells were preincubated with 50, 100 µg/ml of CSEA extracts for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. (A) The NO production was measured by Griess Reagent System. (B) The PGE₂ production was measured by ELISA as described in materials and methods. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); * : P < 0.05; ###, *** : P < 0.001.

5. RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향
 염증에 관여하는 NO는 보통 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서, PGE2는 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어진다. 그래서 RAW 264.7 세포에서 쇠양 EA 추출물이 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 Western blot assay를 통해서 알아보았다. 먼저 RAW 264.7 세포에 약제를 50, 100 µg/ml의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 모두 크게 증가한 것에 비해, 쇠양 EA 추출물과 함께 처리한 군에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 농도 의존적으로 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 6A, 6B). Image 분석 장치를 사용하여 정량적으로 감소효과를 확인해본 결과 쇠양 EA 추출물 100 µg/ml의 처리에 의해서, iNOS는 84.1%, COX-2는 71.2%의 발현 감소효과가 있음을 알 수 있었다.

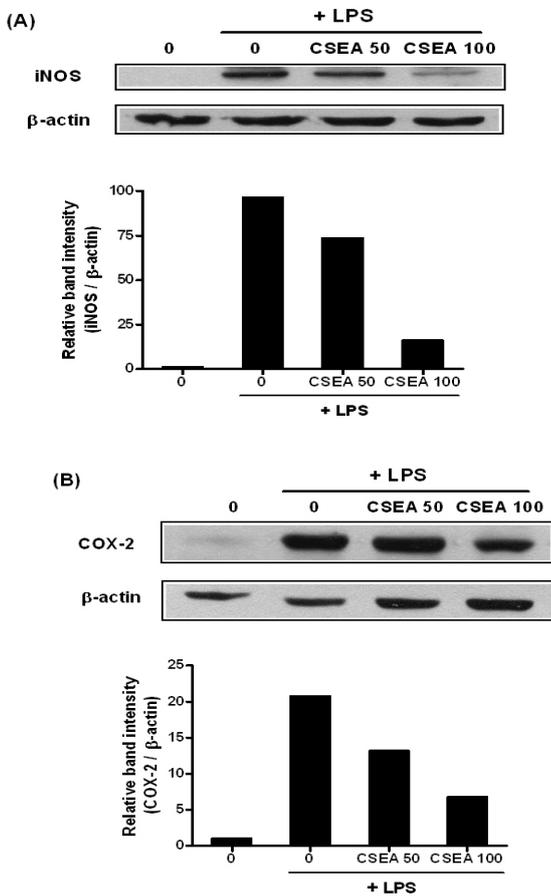


Fig. 6. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 expression by CSEA extracts. RAW 264.7 cells were preincubated with 50, 100 µg/ml of CSEA extract for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The expression levels of iNOS and COX-2 were determined by western blotting as described in materials and methods and the density of band was calculated by GelDoc-It Bioluminescence System. β -actin levels were used as internal markers for loading variation.

6. RAW 264.7 세포에서 쇠양 EA 추출물이 LPS로 유도된 염증성 cytokines의 생성량에 미치는 영향

염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)은 염증을

나타내는 중요한 지표이다. 따라서 RAW 264.7 세포에서 쇠양 EA 추출물이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향을 알아보기로 하였다. RAW 264.7 세포에 약제를 50, 100 µg/ml의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, 50 µg/ml의 농도와 100 µg/ml의 농도에서 각각 14.5, 29.2%의 감소효과가 나타났다(Fig. 7A). 다음으로 IL-1 β 의 경우에는 50 µg/ml의 농도와 100 µg/ml의 농도에서 각각 56.8, 93.7%의 감소효과를 보였고(Fig. 7B), IL-6의 생성은 50 µg/ml의 농도와 100 µg/ml의 농도에서 각각 40.0, 79.4% 감소시켰다. 이상의 결과를 볼 때, 쇠양 EA 추출물은 농도 의존적으로 유의성 있게 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성을 억제하고, 그 중에서도 특히 IL-1 β 의 생성을 억제하는 효과가 가장 우수함을 알 수 있었다.

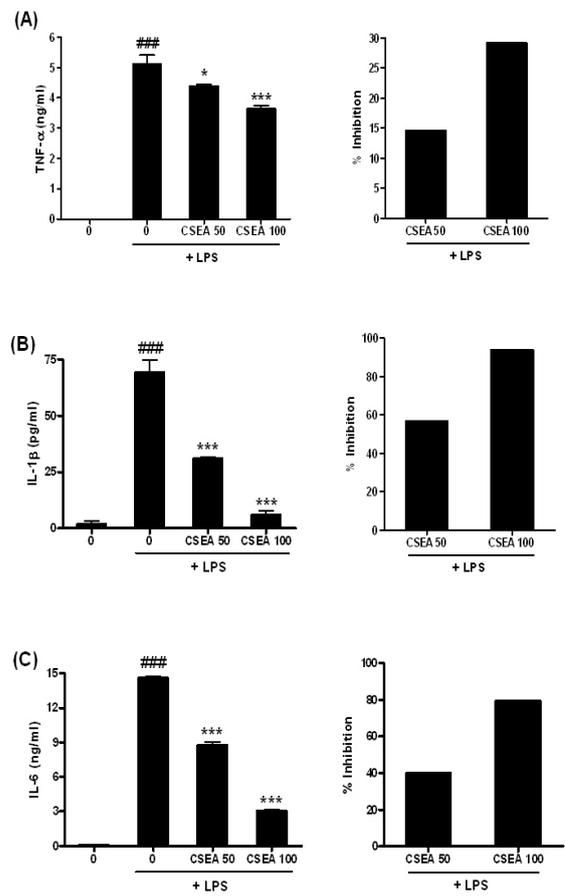


Fig. 7. Inhibition of LPS-induced TNF- α , IL-1 β and IL-6 by CSEA extracts. RAW 264.7 cells were preincubated with 50, 100 µg/ml of CSEA extract for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The TNF- α , IL-1 β and IL-6 production was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); * : P < 0.05; ###, *** : P < 0.001.

7. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향

NF- κ B의 핵으로의 translocation은 I κ B α 의 degradation과 phosphorylation과 직접적으로 연결되어 있기 때문에, NF- κ B의 translocation은 I κ B α 의 phosphorylation, ubiquitination과

고찰

degradation에 의해서 일어나게 된다⁴⁰). 대식세포에서 LPS에 의해서 활성화되는 NF- κ B의 주요 구성요소는 p65 이기 때문에, Western blot을 이용하여 쇠양 EA 추출물이 p65의 활성화에 미치는 영향과 I κ B α 의 phosphorylation에 미치는 영향을 확인해 보았다. RAW 264.7 세포에 약재를 50, 100 μ g/ml의 농도로 18시간 동안 처리한 후 1 μ g/ml의 LPS를 1시간 동안 처리하여 NF- κ B p65의 핵으로의 translocation에 미치는 영향을 nuclear extract를 이용하여 관찰한 결과, LPS 단독처리군이 현저한 translocation을 유발한 것에 비해 쇠양 EA 처리군은 농도의존적으로 뛰어난 저해효과를 보임을 알 수 있었다(Fig. 8A). 또 같은 방법으로 처리를 하고 cytosol extract에서 I κ B α 의 phosphorylation에 미치는 영향을 확인해 본 결과, 역시 쇠양 EA의 처리가 농도의존적으로 LPS에 의해서 유도되는 I κ B α 의 phosphorylation을 저해함을 확인할 수 있었다(Fig. 8B). 종합해 볼 때, 쇠양 EA 추출물은 I κ B α 의 phosphorylation을 억제함으로써 NF- κ B p65의 translocation을 저해한다는 결론을 내릴 수 있었다.

우리 몸은 항상성 유지를 위해 산화촉진물과 산화억제물질이 균형을 이루고 있는데, 이 균형이 깨져서 산화 촉진 쪽으로 기울게 되면 각 기관과 세포에 유해한 작용을 하게 되고, 이를 산화적 스트레스라고 한다. 이런 산화적 스트레스는 기본적으로 노화와 밀접한 관련을 갖고 있으며, 체내 DNA 손상, 지질의 과산화로 인한 세포막의 손상, 단백질과 지질의 산화 등을 가져와 동맥경화나 암, 백내장, 노인성 치매, 파킨슨씨병과 같은 질환 등을 유발 시킨다⁴¹). 대표적인 노화 과정의 일환이자 만성 염증성 질환이라고 할 수 있는 동맥경화의 경우를 예를 들어보면, 여러 가지 동맥경화 위험 인자들은 공통적으로 혈관세포 내의 산화적 스트레스를 증가시키고, 이에 따라 2차적으로 산화환원 반응성 신호 전달계 (redox-sensitive signaling pathway)와 전사인자 (transcription factor)를 활성화함으로써 혈관세포와 면역세포의 상호작용에 의한 염증을 유발하게 된다. 이러한 염증 반응으로 인하여 혈관기능에 장애가 오고, 이것이 만성화되면 결국 동맥경화를 유발한다⁴²). 따라서, 항산화와 항염증 효과를 동반한 천연물은 동맥경화를 비롯한 많은 만성 염증성 질환 (chronic inflammatory disease)의 예방 및 치료제 개발에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

쇄양의 메탄올 추출물과 획분층들의 항산화 효과를 비교해 보기 위해 가장 먼저 DPPH radical 소거활성 실험을 수행하였다. DPPH radical hydrazyl의 질소 원자는 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소 원자를 받아들이는 성질을 가지고 있다. 따라서 수소 공여능이 뛰어난 항산화 물질과 반응을 시키면, 보라빛의 DPPH radical (DPPH \cdot)이 무색의 (DPPH-H) 형태로 전환하게 되므로 비교적 간단하면서도 재현성이 있게 항산화력을 측정할 수 있다⁴³). 실험 결과, 쇠양의 획분층 중 EA 추출물에서 가장 우수한 IC50 값을 보였다(Fig. 2A). 대표적인 ROS의 하나인 superoxide radical은 산소를 이용하는 생체 내의 정상적인 대사 과정에서 생성될 뿐만 아니라, 유기 화합물 (organic compound)들의 자동산화 (autoxidation), 외부로부터 침입한 이물질에 대한 대식세포의 탐식작용 (phagocytosis) 및 효소반응에 의하여 생성될 수 있다. 게다가, superoxide anions는 hydrogen peroxide의 생성 전구물질이며, 특히 Fenton계 반응을 통하면 보다 강한 활성을 지닌 hydroxyl radical의 생성을 유발시킨다⁴⁴). 본 실험에서는 xanthine oxidase를 hypoxanthine과 반응시켜서 superoxide radical을 생성시켰으며, 생성된 superoxide radical은 hypoxanthine을 uric acid로, NBT를 환원형 diformazan으로 변환시키므로 NBT의 색변화를 통해 산화정도를 측정할 수 있다⁴⁵). 그 결과, 쇠양의 획분층 중에서 역시 EA 추출물에서 가장 강한 소거능이 관찰되었다(Fig. 2B). 이어서 대표적인 RNS인 NO와 NO와 superoxide radical의 대사산물로써 그 반응성이 superoxide와 hydrogen peroxide 보다도 강력하지만, 생체 내 방어기구는 아직까지 알려지지 않은 peroxynitrite에⁴⁶) 대한 소거활성도 측정하였다. 본 실험에서 쇠양 획분층의 NO에 대한 소거활성을 비교하기 위하여 SNP로 NO를 생성시키고 이를

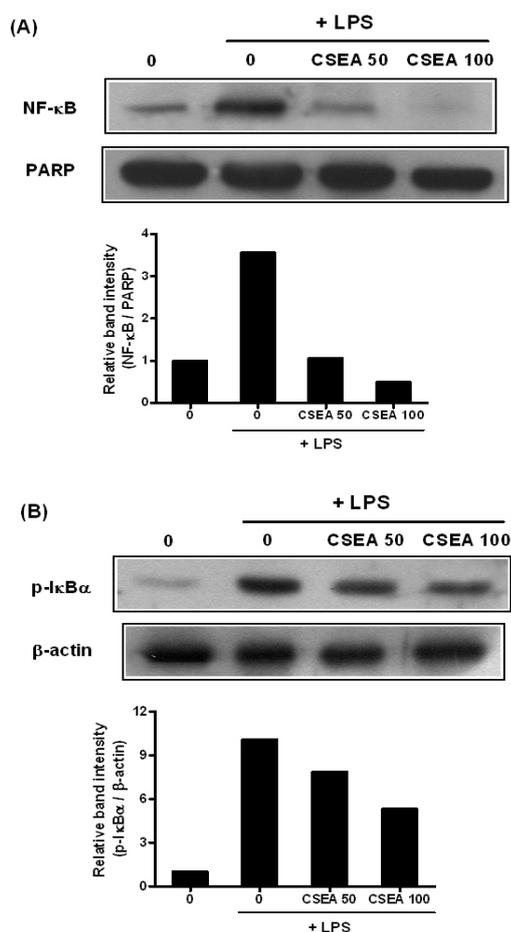


Fig. 8. Effect of CSEA extracts on LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B p65 and on the phosphorylation of I κ B α . RAW 264.7 cells were preincubated with 50, 100 μ g/ml of CSEA extract for 18 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 1 hr. The expression levels of NF- κ B p65 and I κ B α were determined by western blotting using nuclear extracts and cytosol extract, respectively. The density of band was calculated by GelDoc-It Bioimaging System. PARP and β -actin levels were used as internal markers for loading variation.

DAF-2로 포집하여 형광강도를 측정된 결과, EA 추출물이 가장 효과적인 NO 소거활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었고(Fig. 2C), DHR 123 assay를 이용한 peroxynitrite 소거활성 실험에서도 역시 EA 추출물이 가장 효과적인 활성이 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 쇠양의 추출물들 중에서 EA 추출물이 수소 공여능, ROS와 RNS 소거능 면에서 모두 가장 뛰어난 항산화 물질이라는 결론을 내릴 수 있었다.

ROS와 RNS는 DNA, 단백질 등 모든 생물학적 target에 산화적 손상을 야기할 수 있기 때문에, 다양한 염증 자극인자에 의해서 대식세포와 다른 염증 관련 세포에서 생성되는 ROS와 RNS는 염증 과정에서 매우 중요한 역할을 한다^{47,48}. 따라서 in vitro 상에서 가장 뛰어난 항산화 활성을 보인 쇠양 EA 추출물을 선정하고, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 다음 실험을 진행하였다. 먼저, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 MTS assay를 실행하여 세포독성이 없는 약재의 농도를 선정하였다(Fig. 3). 그리고 LPS와 H₂O₂를 산화 유발제로 사용하여 EA 추출물이 RAW 264.7 세포의 세포 내 ROS 생성을 얼마나 효과적으로 방어하는지 DCF-DA assay를 통해서 확인했다. DCF-DA는 세포에 전처리하면 세포 안으로 쉽게 들어가고, H₂O₂와 만나면 형광을 띠는 DCF를 생성하게 되므로 DCF의 형광강도를 측정하면 세포 안의 ROS 생성량을 측정할 수가 있다. 그리고 LPS는 세포 안의 ROS를 효과적으로 유발시키는 물질로 알려져 있다⁴⁹. 이 실험의 결과, EA 추출물은 농도의존적으로 세포 내의 ROS 생성을 효과적으로 억제함을 알 수 있었고(Fig. 4A, 4B), in vitro 상의 항산화 활성이 세포 안에서도 유효함을 확인할 수 있었다.

대식세포는 인체 내에 고르게 분포되어 있고, 적응 면역과 선천 면역 모두에 관여하는데, 특히 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 대식세포의 표면에는 Toll-like receptors (TLRs)가 있어서 병원체를 감작하게 되는데, LPS의 경우 TLR 4를 자극하게 되어서 NF-κB를 활성화시키고, NO, PGs와 같은 염증인자와 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 다양한 염증성 cytokines을 발현시키게 된다⁵⁰.

NO는 생리적, 병리적 모두에서 중요한 역할을 하는 조절 분자인데, 적절한 농도의 NO는 생리적으로 평활근의 이완, 혈소판 응집 억제, 면역 조절, 혈관 확장, 신경전달 등에 꼭 필요하다. 그렇지만, 만성적인 NO의 생성은 염증인자로서 여러 가지 만성 염증성 질환을 유발하는 주요 원인이 된다. NO는 NO synthase (NOS)에 의해서 생성이 되는데, NOS에는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS), 세 종류의 유사형태가 존재한다. 이 중에서 활성화된 대식세포에서 NO를 다량으로 분비시켜서 염증 반응을 촉진하는 것은 iNOS이다. 또 다른 중요한 염증 인자로 COX-2에 의해서 생성되는 PGE₂는 혈관의 투과성을 높이기 때문에 염증과정에서 발열, 종창, 통증 등을 유발할 수 있다. 또 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 cytokine은 활성화된 대식세포에서 주로 생산되며 선천면역과 관계되어 내피세포와 백혈구에 작용하여 미생물에 대한 초기 염증반응을 자극하고 조절한다. 염증 반응의 측면에서 보았을 때, 이러한

cytokines의 대량 생산은 발열, 내피세포의 염증, 호중구의 활성화, 근육과 지방의 분해 증가 등을 유발하여, 염증 질환은 물론이고 심한 경우에는 패혈성 쇼크까지 유발할 수 있다⁵¹. 따라서 활성화된 대식세포에서 염증인자인 NO와 PGE₂ 그리고 이 염증인자들의 전구물질인 iNOS와 COX-2, 염증성 cytokines의 과발현을 막는 것은 염증반응을 조절함에 있어서 아주 중요한 요소가 될 수 있을 것이다. RAW 264.7 세포에 쇠양 EA 추출물을 처리하고, 1시간이 지난 후에 LPS를 처리하여 염증을 유발한 다음 염증인자인 NO, PGE₂와 그 전구물질인 iNOS, COX-2 발현, 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성에 미치는 영향을 살펴 보았다. 그 결과, 쇠양 EA 추출물은 모두 LPS로 유도된 염증인자들과 전구물질들 그리고 염증성 cytokines의 생성을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고, 이러한 효과는 농도의존성을 보였다(Fig. 5-7).

NF-κB는 TNF-α, IL-1β, IL-6를 포함하는 일부 주요 염증촉진 cytokines의 발현을 조절하고, 또 COX-2와 iNOS의 활성화를 조절하며, 세포부착분자와 금속분해효소의 활성을 조절하는 등 염증반응 전반에 걸쳐 중요한 역할을 한다⁵². 실제로 NF-κB의 활성 조절이 제대로 이루어지지 않는 것은 암이나, 관절염, 신경퇴화성 질환, 천식, 패혈증 등 수많은 염증성 질병과 직결된다는 보고도 많이 되어있다^{53,54}. 따라서 NF-κB 활성을 억제하는 것은 항염증 효과를 갖는 물질의 선별에 있어서 중요한 기준이 된다. Western blotting을 통해서 알아본 결과, 쇠양 EA 추출물은 LPS에 의해서 유도된 NF-κB p65의 핵으로의 translocation을 농도의존적으로 억제함을 알 수 있었고(Fig. 8A), 이 결과는 쇠양 EA 추출물의 염증인자인 NO, PGE₂와 그 전구물질인 iNOS, COX-2 발현, 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성 억제 효과가 NF-κB의 활성 억제와 연관되어 있다는 것을 보여준다. NF-κB는 활성화되지 않은 대식세포에서는 inhibitors of κB (IκBs)와 결합되어 있기 때문에 세포질에 위치하게 된다. 그러나 LPS와 같은 자극 물질로 인하여 세포가 활성화되면, IκB kinase (IKK) complex를 통해서 IκB가 phosphorylation 되고, degradation 되므로 NF-κB는 세포의 핵 안으로 이동하여 각종 염증 관련 인자들을 전사시키는 작용을 하게 된다⁵⁵. 따라서 쇠양 EA 추출물이 LPS로 유도되는 IκBa의 phosphorylation에 미치는 영향을 알아본 결과, 역시 농도의존적으로 IκBa의 phosphorylation을 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 8B). 이상의 결과를 종합해 볼 때, 쇠양 EA 추출물은 IκBa의 phosphorylation을 억제하는 기전을 통해서 NF-κB 활성을 저해한다는 사실을 알 수 있었다.

NF-κB의 활성화와 세포 내에서 생성되는 ROS와의 메커니즘적인 연관 관계는 아직까지 정확하게 밝혀지지 않았다. NF-κB 활성화에 관여하는 인자들에는 TNF-α, lymphotoxin, IL-1β, IL-6와 같은 여러 가지 염증성 cytokines, mitogens, LPS, 단백질 합성 저해제, 산화적 스트레스, 자외선, phorbol esters 등이 알려져 있는데⁵⁶, 흥미로운 점은 이 물질들이 대부분 세포 내에서 ROS를 발생하는 것으로 알려져 있고, 항산화 효과를 지닌 화합물이나 천연물이 NF-κB 활성화를 효과적으로 저해시킨다는 연구 보고는 아주 많다⁵⁷⁻⁵⁹. 이러한 사실은 NF-κB 활성화가 대부분 산화

반응에 의해 촉진됨을 보여주는 것으로 산화와 염증의 밀접한 연관성을 잘 보여주고 있다고 할 수 있고, *in vitro* 상에서 뛰어난 항산화 활성을 보였고, 대식세포 내에서 LPS 자극으로 발생한 ROS의 생성을 유의성 있게 감소시킨 쇠양 EA 추출물이 좋은 항염증 활성 역시 보이는 본 실험 결과도 산화와 염증 간의 밀접한 연관성과 관련지어 생각해 볼 수 있을 것이다.

종합해 보면, 쇠양의 획분층 중에서 가장 뛰어난 항산화 활성을 보인 EA 추출물을 사용하여 마우스 대식세포에서 항염증 실험을 진행한 결과, EA 추출물은 항염증 효과 역시 우수했다. 쇠양 EA 추출물은 세포 내 ROS 생성 역시 유의성 있게 감소시키는 효능도 보였는데, 이는 항산화와 항염증 간의 긴밀한 연관성을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 따라서 쇠양 EA 추출물은 천연 항산화제의 개발과 동맥경화, 관절염, 고혈압, 암, 당뇨, 천식 등의 만성 염증성 질환 치료제의 연구에 효과적으로 응용해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

쇄양 획분층의 항산화 활성과 마우스 대식세포에서의 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

쇄양 메탄올 추출물을 물과 혼합한 뒤, 차례로 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol과 섞어서 획분층별 추출물을 분리했다. *in vitro* 상에서 DPPH radical, ROS의 일종인 superoxide radical 그리고 RNS의 일종인 nitric oxide, peroxynitrite의 소거활성을 추출물 별로 비교한 결과, 모든 radical에서 가장 좋은 소거 활성을 보인 것은 EA 추출물임을 알 수 있었다.

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 EA 추출물의 독성을 조사하여 생존율에 영향을 미치지 않는 농도 (50, 100 μ g/ml)에서 실험을 진행하였다. 이는 쇠양 추출물의 항산화 및 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약제들의 고유한 특성임을 말한다. RAW 264.7 세포에 4 mM의 H₂O₂와 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 세포 내 ROS 생성을 유도한 결과, EA 추출물은 농도의존적으로 ROS의 생성을 막았다. 이는 *in vitro* 상의 항산화 활성이 세포 내에서도 적용됨을 의미한다. RAW 264.7 세포에 약제를 1시간 전 처리한 후, 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그 결과, EA 추출물은 LPS로 유도되는 염증인자인 NO, PGE₂의 생성량과 그 전구물질인 iNOS, COX-2의 발현도 크게 저해하였다. 또한 염증성 cytokines의 생성 역시 현저히 감소시켰다. 쇠양 EA 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포의 nuclear extract에서 NF- κ B p65의 활성을, cytosolic extract에서 phosphorylation된 I κ B α 의 양을 확인해 본 결과, 쇠양 EA 추출물은 I κ B α 의 phosphorylation을 억제하는 기전을 통해서 NF- κ B 활성을 저해한다는 사실을 알 수 있었고, 쇠양 EA 추출물이 염증인자와 염증성 cytokines의 발현을 억제한 것이 NF- κ B의 활성 억제와 연관되어 있다는 것도 알 수 있었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 쇠양의 EA 추출물은 뛰어난 항

산화 효과 및 항염증 효과를 가지고 있었으며, 이는 천연 항산화제의 개발과 동맥경화, 관절염, 고혈압, 암, 당뇨, 천식 등의 만성 염증성 질환 치료제의 연구에 효과적으로 응용해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터 육성사업(R13-2005-013-01000-0)의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. Park, S.N. Skin aging and antioxidants. *J Korean Soc Cosmetic Chem* 23: 75-132, 1997.
2. Haddad, J.J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* 14(11):879-897, 2002.
3. Bunn, H.F., Poyton, R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 76(3):839-885, 1996.
4. Delanty, N., Dichter, M.A. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* 98: 145-153, 1998.
5. Brune, B., Zhou, J., Von Knethen, A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl* 84: 22-24, 2003.
6. Azad, N., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11(1):11-15, 2008.
7. Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., Farnarier, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24(1):25-29, 2003.
8. O'Connell, M.A., Bennett, B.L., Mercurio, F., Manning, A.M., Mackman, N. Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells. *J Biol Chem* 273(46):30410-30414, 1998.
9. Ohshima, H., Bartsch, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 305(2):253-264, 1994.
10. Forman, H.J., Torres, M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 22(4-5):189-216, 2001.
11. Lo, A.H., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.K. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 23(6):983-991, 2002.
12. Bai, S.K., Lee, S.J., Na, H.J., Ha, K.S., Han, J.A., Lee, H., Kwon, Y.G., Chung, C.K., Kim, Y.M. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-

- stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Exp Mol Med* 37(4):323-334, 2005.
13. Kamata, H., Manabe, T., Kakuta, J., Oka, S., Hirata, H. Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NFkappaB: effects of N-acetylcysteine and H₂O₂ on the receptor tyrosine kinases, the MAP kinase cascade, and IkappaB kinases. *Ann N Y Acad Sci* 973: 419-422, 2002.
 14. Hinz, B., Brune, K. Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300(2):367-375, 2002.
 15. 이효승, 허숙경, 윤현정, 최재우, 정재하, 박선동. 마우스 대식 세포에서 혈갈(血竭)의 항산화 및 항염증 효과. *大韓本草學會誌* 23(2):179-192, 2008.
 16. Lin, Y.L., Lin, J.K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol* 52(3):465-472, 1997.
 17. Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* 126(3):673-680, 1999.
 18. Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F., Lin, J.K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20(10):1945-1952, 1999.
 19. 김창민 外. 完譯 中藥大辭典. 서울, 정담출판사, pp 2499-2500, 1997.
 20. Dan, B., Andrew, G. *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica Revised ed.* Seattle, Eastland Press, pp 340-341, 2003.
 21. 王本祥. 現代中藥藥理學. 天津, 天津科學技術出版社, pp 1272-1273, 1997.
 22. 이진무, 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭, 최은미. 쇠양(鎭陽)의 기간별 투약이 수컷 생쥐 생식능력에 미치는 영향. *大韓韓方婦人科學會誌* 20(1):16-31, 2007.
 23. 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭, 한지영. 쇠양(鎭陽)의 농도별 투약이 수컷 생쥐 생식능력에 미치는 영향. *大韓韓方婦人科學會誌* 19(2):62-76, 2006.
 24. 최홍식. 쇠양(鎭陽)과 두충(杜仲)이 골다공증 유발 후 흰쥐의 골밀도와 체중에 미치는 영향. *大韓本草學會誌* 23(2):19-24, 2008.
 25. 장문석, 양용모, 김도림, 박은화, 박수연, 박성규. 쇠양(鎭陽)의 Diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) 소거 활성 및 HepG2 세포에 대한 항산화 효과. *大韓韓醫學方劑學會誌* 15(2): 139-145, 2007.
 26. Lu, Y., Wang, Q., Melzig, M.F., Jenett-Siems, K. Extracts of *Cynomorium songaricum* protect SK-N-SH human neuroblastoma cells against staurosporine-induced apoptosis potentially through their radical scavenging activity. *Phytother Res* 23(2):257-261, 2009.
 27. Chu, Q., Tian, X., Lin, M., Ye, J. Electromigration profiles of *Cynomorium songaricum* based on capillary electrophoresis with amperometric detection. *J Agric Food Chem* 54(21):7979-7983, 2006.
 28. Jiang, Z.H., Tanaka, T., Sakamoto, M., Jiang, T., Kouno, I. Studies on a medicinal parasitic plant: lignans from the stems of *Cynomorium songaricum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 49(8):1036-1038, 2001.
 29. Ma, C.M., Jia, S.S., Sun, T., Zhang, Y.W. Triterpenes and steroidal compounds from *Cynomorium songaricum*. *Yao Xue Xue Bao* 28(2):152-155, 1993.
 30. Zhang, R.X., Jia, Z.P., Li, M.X., Wang, J., Yin, Q., Luo, J.D., Liu, H.Y. Study on the effect of Part III from *Cynomorium songaricum* on immunosuppressive mice induced by cyclophosphamide. *Zhong Yao Cai* 31(3):407-409, 2008.
 31. Ma, C.M., Wei, Y., Wang, Z.G., Hattori, M. Triterpenes from *Cynomorium songaricum*--analysis of HCV protease inhibitory activity, quantification, and content change under the influence of heating. *Nat Med (Tokyo)* 63(1):9-14, 2009.
 32. Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. *Gen Pharmacol* 32: 661-667, 1999.
 33. Gotoh, N., Niki, E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochim Biophys Acta* 1115: 201-207, 1992.
 34. Sutherland, H., Khundkar, R., Zolle, O., McArdle, A., Simpson, A.W., Jarvis, J.C., Salmons, S. A fluorescence-based method for measuring nitric oxide in extracts of skeletal muscle. *Nitric Oxide* 5: 475-481, 2001.
 35. Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropulos, H., Beckman, J.S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biol Med* 16: 149-156, 1994.
 36. Desai, A., Vyas, T., Amiji, M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci* 97(7):2745-2756, 2008.
 37. Wang, S., Chen, Y., He, D., He, L., Yang, Y., Chen, J., Wang, X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol* 114(3):458-462, 2007.
 38. Wang, H., Joseph, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27: 612-616, 1999.

39. Rong, Y., Geng, Z., Lau, B.H. Ginko biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 20: 121-127, 1996.
40. Moynagh, P.N. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* 118(Pt 20):4589-4592, 2005.
41. Chung, I.M., Kim, K.H., Ahn, J.K. Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. *Kor J Med Sci* 6: 311-322, 1998.
42. Kunsch, C., Medford, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85(8):753-766, 1999.
43. 김민산, 허중문, 박종철. 207종 한약과 활성 한약이 포함된 19종 한약 방제의 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl 라디칼 소거 작용. *대한한의학방제학회지* 12(1):159-175, 2004.
44. Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compound. *J Agric Food Chem* 48: 5338-5342, 2000.
45. Madamanchi, N.R., Hakim, Z.S., Runge, M.S. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Thrombo Haemost* 3: 254-267, 2004.
46. Lee, J.Y., No, J.K., Soung, D.Y., Kim, Y.J., Je, J.H., Kim, M.S., Lee, K.H., Chung, H.Y. ROS/RNS scavenging activity of rosmarinic acid. *Kor J Gerontol* 15(2):10-16, 2005.
47. Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., Darley-Usmar, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3):385-400, 1999.
48. D'Acquisto, F., May, M.J., Ghosh, S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv* 2(1):22-35, 2002.
49. Woo, C.H., Lim, J.H., Kim, J.H. Lipopolysaccharide induces matrix metallo proteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase -activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J Immunol* 173(11):6973-6980, 2004.
50. Gomez, P.F., Pillinger, M.H., Attur, M., Marjanovic, N., Dave, M., Park, J., Bingham, C.O. 3rd, Al-Mussawir, H., Abramson, S.B. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 175(10):6924-6930, 2005.
51. Abul, K.A., Andrew, H.L., Shiv, P. 세포분자면역학 6판. 서울, 이퍼블릭, pp 271-296, 2008.
52. Li, Q., Verma, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(10):725-734, 2002.
53. Pierce, J.W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S.A., Collins, T., Gerritsen, M.E. Novel inhibitors of cytokine-induced I(kappa)Balpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 272(34):21096-21103, 1997.
54. Lewis, A.J., Manning, A.M. New targets for anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Chem Biol* 3(4):489-494, 1999.
55. Park, M.H., Song, H.S., Kim, K.H., Son, D.J., Lee, S.H., Yoon, D.Y., Kim, Y., Park, I.Y., Song, S., Hwang, B.Y., Jung, J.K., Hong, J.T. Cobrotoxin inhibits NF-kappa B activation and target gene expression through reaction with NF-kappa B signal molecules. *Biochemistry* 44(23):8326-8336, 2005.
56. Grilli, M., Chiu, J.J., Leonardo, M.J. NF-κB Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 143: 1-62, 1993.
57. Ivanov, V., Merckenschlager, M., Ceredig, R. Antioxidant treatment of thymic organ cultures decreases NF-κB and TCF1(α) transcription factor activities and inhibits alpha beta T cell development. *J Immunol* 151(9):4694-4704, 1993.
58. Lee, S.J., Bai, S.K., Lee, K.S., Namkoong, S., Na, H.J., Ha, K.S., Han, J.A., Yim, S.V., Chang, K., Kwon, Y.G., Lee, S.K., Kim, Y.M. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol Cells* 16(1):97-105, 2003.
59. Shishodia, S., Potdar, P., Gairola, C.G., Aggarwal, B.B. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of I(kappa)B kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis* 24(7):1269-1279, 2003.