

감송향의 in vitro 항산화 및 항염증 효과

백 설 · 최재혁 · 고성훈 · 이용재 · 차동석 · 박은영¹ · 강양규² · 전 훈*

우석대학교 약학대학, 1: 전주대학교 대체의학대학, 2: (유)해원

Antioxidant and Anti-inflammatory Effect of *Nardostachys Chinensis* in IFN- γ /LPS-stimulated Peritoneal Macrophage

Seol Baek, Jae Hyuk Choi, Sung Hoon Ko, Yong Jae Lee, Dong Seok Cha, Eun Young Park¹,
Yang Gyu Kang², Hoon Jeon*

College of Pharmacy, Woosuk University, 1: Department of Rehabilitation, College of Alternative Medicine, Jeonju University,
2: Heawon Ltd.

Nardostachys chinensis has been used widely as a traditional medicine for the treatment of diverse diseases. The dried plant was extracted with 85% methanol extract (NC). We investigated the antioxidant properties of NC on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, superoxide anion and nitric oxide radical scavenging capacity under in vitro assays. NC showed potent antioxidant activity, compared to ascorbic acid. In macrophages, nitric oxide is released as an inflammatory mediator and has been proposed to be an important modulator of many pathophysiological conditions in inflammation. In the present study, it was also investigated that the inhibition effects on NO and the mechanism of down-regulation of immune response by NC in IFN- γ /LPS-stimulated mouse (C57BL/6) peritoneal macrophages. Extracts of NC suppressed NO production and the expression of iNOS and COX-2. The present results indicate that NC has an antioxidant and anti-inflammatory properties and therefore may be beneficial in diseases which related to oxidative stress-mediated chronic inflammatory disorders.

Key words : *Nardostachys chinensis*, antioxidant, anti-inflammatory

서 론

활성산소란 산소가 가지는 화학적 특성으로 인하여 생성되는 free radical 및 이로부터 유래된 산소화합물을 일컬으며 대부분 불안정하여 전자를 잃거나 얻어서 보다 안정된 상태로 가려는 성질이 있다. 이들은 높은 반응성을 바탕으로 생체 내에서 DNA나 세포막 등에 작용하여 산화적 손상을 일으킨다고 보고되고 있다¹⁾. 생체의 산화반응 과정 중에 생성되는 활성산소들은 체내의 항산화효소 (Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase)에 의해 제거되나²⁾, 이를 초과한 과량의 활성산소종 (Reactive oxygen species; ROS)은 류마티스 관절염과 같은 퇴행성 질환이나 암, 동맥경화 등의 성인병과 깊은 관련이 있다.

이와 같은 과량의 ROS로 인한 산화적 스트레스가 항산화물

질에 의해 감소되는 것이 알려지면서 항산화물질을 개발하기 위한 많은 연구들이 이루어지고 있으며, 최근들어 폐놀계 합성 항산화제인 BHT (Butylated Hydroxytoluene), BHA (Butylated hydroxyanisole) 등의 부작용이 밝혀짐에 따라 한약을 비롯한 천연물로부터 항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다³⁾.

염증 (inflammation)이란 macrophage나 mast cell 등의 백혈구에서 생성된 다양한 신호전달물질이 관여하는 일련의 병리적인 과정으로서, 이 중 macrophage는 대표적인 염증 매개물인 NO (nitric oxide)생성에 관여한다. NO는 급성 및 만성염증 반응에서 L-arginine으로부터 iNOS (inducible nitric oxide synthase)에 의해 과량 생성되며 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 또한 COX-2 (cyclooxygenase-2)는 arachidonic acid로부터 염증매개물질인 PGE₂ (prostaglandin E₂) 생성을 촉매하는 효소로서 iNOS와 마찬가지로 염증반응에 중요한 역할을 한다. 따라서 NO의 생성이나 iNOS, COX-2의 발현 등은 항염증 물질을 찾

* 교신저자 : 전 훈, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : hoonj6343@hanmail.net, · Tel : 063-290-1577

· 접수 : 2009/04/17 · 수정 : 2009/06/15 · 채택 : 2009/07/23

는데 좋은 지표가 될 수 있을 것으로 생각된다.

감송향은 敗醬科 (Valerianaceae)에 속하는 다년생 초본으로 甘松香 (*Nardostachys chinensis* BATAL.)과 寬葉甘松 (N. *jatamansae* DC.)의 근과 근경을 건조한 것으로서 行氣止痛, 開鬱醒脾 등의 효능으로 胃痛, 胸腹脹滿, 頭痛 등의 치료에 사용되어져 왔다⁴⁾. 감송향의 알려진 구성성분으로는 nardostachone, nardosinone, 1,8,9,10-tetrahydro aristolan-2-one, debilon 등이 있고 calarene, delta 1(10)-aristolenone-2, jatamansinol 등의 정유 성분 등이 확인되었다⁵⁾. 감송향의 약리작용에 관한 연구로는 nardosinone이 신경돌기의 성장을 촉진한다는 보고가 있고^{6,7)}, nardosinone 및 debilon 등의 sesquiterpene류는 항암효과가 있는 것으로 밝혀졌으며⁸⁾ 또한 nardoguaianone의 진통 및 항말라리아에 대한 활성이 발표되었다⁹⁾. 그러나 아직까지 감송향에 대한 연구는 많이 부족한 실정이며 감송향의 항산화 및 항염증 활성 역시 보고된바 없다.

이에 본 연구에서는 감송향의 항산화 활성을 *in vitro* 상에서 확인하였고, LPS로 유도된 쥐의 복강 대식세포에서 생성되는 NO나 iNOS, COX-2 등의 발현에 미치는 영향을 알아보았으며 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline, sodium dodecyl sulfate (SDS), fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co.에서 anti-mouse iNOS는 Santa Cruz에서 anti-rabbit COX-2는 Cayman Chemical에서 구입한 것을 사용하였다. L-ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), xanthine, xanthine oxidase, nitroblue tetrazolium (NBT), sodium nitro prusside (SNP), lipopolysaccharide (LPS), anti-rabbit actin은 Sigma Co.에서 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), 24 well plate (Costar), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), electrophoresis system (Bio-Rad), XAR-5 X-ray film (Kodak), microplate reader (Tecan) 등을 사용하였다.

2. 감송향 추출물 제조

본 실험에 사용된 감송향은 읍니허브에서 구입한 것을 사용하였다. 건조된 감송향 300 g은 85% 메탄올 5000 ml로 2시간 동안 초음파 추출하였으며, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하였다. 농축액은 freeze dryer를 이용하여 동결 건조하였으며, NC 추출물 12.49 g (수득율 6.245%)을 얻었다.

3. DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical에 대한 감송향의 영향을 관찰하기 위해 Gyamfi 등의 방법¹⁰⁾을 응용하여 실험하였다. 0.25 mM DPPH

(dissolved absolute ethanol) 495 μ l와 여러 농도의 감송향 추출물 5 μ l를 암실에서 20분 동안 교반한 후 microplate reader (GENios, Tecan, Austria)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, DPPH radical의 소거능은 % inhibition으로 환산하여 표기하였다.

4. Superoxide anion 소거활성 측정

Superoxide radical ($\bullet O_2$)에 대한 소거능 (SOD mimic activity)은 Ibrahim 등의 방법¹¹⁾을 일부 수정하여 사용하였다. 먼저 Reaction mixture (1.6 mM xanthine in PBS, pH 8.0)와 여러 농도의 감송향 추출물 5 μ l를 잘 섞은 다음 37°C에서 5분간 정치하였다. 1 ml의 xanthine oxidase (0.05 U/ml)을 첨가하여 반응을 시작하였으며, 37°C에서 20분간 반응시킨 후 2 ml의 SDS (69 mM)을 첨가하여 반응을 종로시켰다. 대조군은 시료 대신 D.W를 넣어 실험하였고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 NBT의 감소량을 확인하였다.

5. Nitric oxide 소거활성 측정

Sodium nitroprusside (SNP; 5 mM) 495 μ l와 여러 농도의 감송향 추출물 5 μ l를 잘 섞은 다음 실온에서 2시간 30분 동안 반응시켰다. SNP에 의해 생성된 NO에 대한 감송향의 효과는 Griess reagent (1% sulphanilamide and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H₃PO₄)와 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였으며, 결과는 % inhibition으로 환산하여 표기하였다.

6. 복강 대식세포의 분리 및 세포배양

쥐의 복강 대식세포는 C57BL/6 6주령 male에 TG 2.5 ml를 주사하여 3일 후 cell을 분리하였다. 분리한 세포는 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 DMEM 배지에 배양 하였으며, 37°C의 포화 습도가 유지되는 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

7. 세포생존도 측정

쥐의 복강 대식세포를 24 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주한 다음 감송향을 1, 10, 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 24시간이 지난 다음 세포에 0.5 mg/ml의 MTT 50 μ l를 처리하고 3시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 micro plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. Nitric Oxide 발현량 측정

IFN- γ 와 LPS에 의해 생성되는 NO의 양은 세포배양액에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 복강 macrophage를 3×10^5 cells/well 이 되도록 24 well plate에 분주한 다음 여러 농도의 감송향 (1, 10, 100 μ g/ml)을 처리하고 IFN- γ 10³ U/ml와 LPS 1 μ g/ml를 처리하여 48 시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포배양액과 Griess 시약을 각각 100 μ l씩 혼합하

여 37°C에서 10 분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정 하였으며, NO₂⁻의 농도는 NaNO₂의 검량선에 의해 환산하였다.

9. Immunoblot analysis

포집된 세포는 40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 120 mM NaCl 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 0.1% nonidet P-40, 1 mM Na₃VO₄, PI cocktail이 포함된 lysis buffer 에 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 sample buffer와 혼합하여 100°C에서 3분 동안 가열하여 단백질 변성을 유도하였다. 완성된 cell lysate는 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 한 다음 분리된 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane 으로 electroblotting에 의해 transfer하였고, membrane은 5% skim milk에 반응시켜 비특이적 단백질을 blocking 하였다. 일 차 항체인 iNOS와 COX-2를 skim milk에 각각 1:500, 1:5000으로 희석하고, 2시간 동안 각각 항원 항체 반응을 시킨 다음 5분 간 3번 PBS-T로 씻어내고 이차 항체인 anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG conjugated HRP를 1시간 30분 동안 반응시킨 후, ECL kit를 사용하여 X-ray film에 감광시켜 발현된 단백질의 양을 분석하였다.

10. 통계처리

본 실험에서 얻은 실험군 간의 데이터는 student's t-test로 분석하였으며 대조군과 비교하여 $p < 0.001$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 감송향의 DPPH radical 소거활성 측정

감송향의 전자 공여능에 의한 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH 자유기 소거율을 측정한 결과 10, 100 및 1,000 µg/ml 의 농도에서 각각 7.62 ± 2.47, 40.5 ± 1.95, 86.97 ± 3.47 및 80.7 ± 0.43%의 농도의존적인 자유기 소거효과를 보였는데, 특히 1000 µg/ml의 농도에서는, 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid 의 소거효과 (86.7 ± 0.38%)와 유사한 효과를 보여 강력한 자유기 소거능이 확인되었다(Fig. 1).

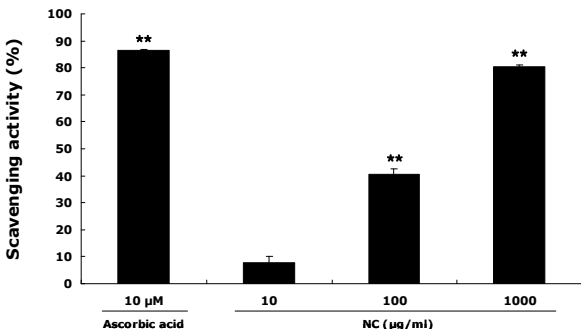


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of NC. The values are % inhibition compared with vehicle treated group. Results are means ± S.D. of three repeated experiments and the symbol ** represents statistically difference from vehicle treated group (** $p < 0.001$).

2. 감송향의 superoxide anion 소거활성 측정

활성산소종 (Reactive oxygen species) 가운데 하나인 superoxide anion에 대한 감송향의 소거활성은 xanthine/xanthine oxidase system에서 생성된 superoxide anion에 대한 NBT 환원능으로 측정하였다. 실험 결과 감송향은 10 및 100 µg/ml 의 농도에서는 각각 3.81 ± 1.97, 27.51 ± 1.35의 비교적 약한 소거활성을 나타낸 반면, 1,000 µg/ml의 농도에서 superoxide anion을 거의 완벽하게 소거하는 매우 강한 소거능을 나타내었 으며, 양성 대조군인 ascorbic acid 보다 높은 효과를 보여주었다 (Fig. 2).

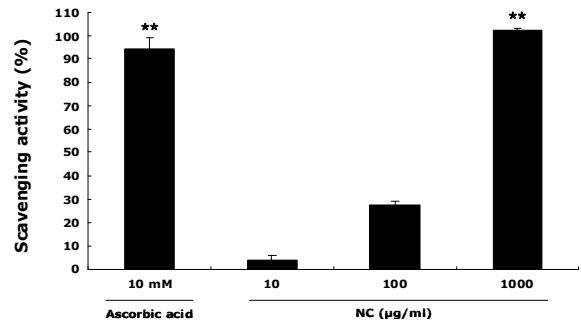


Fig. 2. Inhibition effect of NC on NBT reduction in the xanthine oxidase/xanthine system. The values are % inhibition compared with vehicle treated group. Ascorbic acid used as positive control. Results are shown as means ± S.D. of three repeated experiments and the symbol ** represents the significance of the difference from the control (** $p < 0.001$).

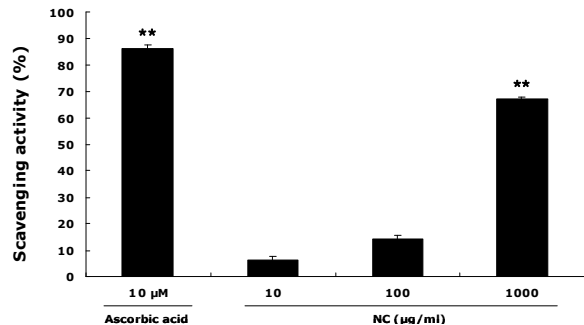


Fig. 3. Scavenging effect of NC on nitric oxide, generated with 5 mM SNP. The values are % inhibition compared with vehicle treated group. Ascorbic acid used as positive control. Results are shown as means ± S.D. of three repeated experiments and the symbol ** represents the significance of the difference from the control (** $p < 0.001$).

3. 감송향의 nitric oxide 소거활성 측정

SNP는 빛의 노출에 의해 NO를 방출시키는 무기물질로서 반응 시간과 SNP의 농도에 따라서 NO의 방출량이 결정된다. 반응 시간에 따른 SNP의 NO 생성량을 측정하기 위해 30분 단위로 NO 생성을 확인한 결과, 반응시간이 2시간 30분에 이르기까지 NO생성량은 꾸준히 증가하였으며 그 이상의 반응시간에서는 큰 변화가 없었다 (Data not shown). 또한 SNP의 농도에 따라 생성 되는 NO량을 확인 하기 위해 0.5, 1 및 5 mM의 농도의 SNP에서 방출되는 NO의 양을 조사한 결과 5 mM의 농도에서 생성되는 NO의 양이 0.5 mM의 약 15배, 1 mM의 약 5배 정도되는 것

을 관찰할 수 있었다 (Data not shown). 이러한 결과를 바탕으로 본 실험에서는 5 mM의 SNP와 감송향을 2시간 30분 동안 반응시켜 감송향이 SNP의 NO 방출에 미치는 영향을 조사하였으며, 감송향은 농도가 증가함에 따라 nitric oxide 소거능이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3).

4. 감송향이 쥐의 복강 대식세포의 생존도에 미치는 영향

감송향의 세포독성 여부를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 아무것도 투여하지 않은 대조군에 비해 rIFN- γ 와 LPS 투여군은 세포생존도가 $8.23 \pm 2.63\%$ 감소함을 확인할 수 있었으며, 쥐의 복강 대식세포에 감송향 추출물을 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 결과 유의성 있는 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 4).

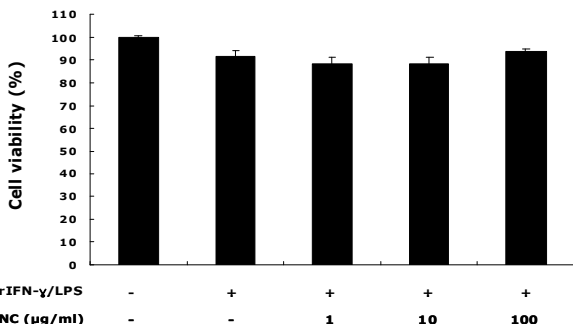


Fig. 4. Effects of NC on the viability in peritoneal macrophages. Cell viability was evaluated by MTT colorimetric assay as described in the method. The results are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments duplicate in each run.

5. 쥐의 복강 대식세포에서 IFN- γ 와 LPS로 유도된 NO 생성에 대한 감송향의 억제 효과

쥐의 복강 대식세포에서 rIFN- γ 와 LPS에 의해 유도된 NO $_2^-$ 의 양을 Griess reaction을 통하여 감송향의 NO 생성 저해 활성을 측정하였다. rIFN- γ 와 LPS자극에 의해서 NO 생성량이 4.75 배 증가함이 관찰되었고, 증가된 NO는 감송향 처리에 의해서 농도의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

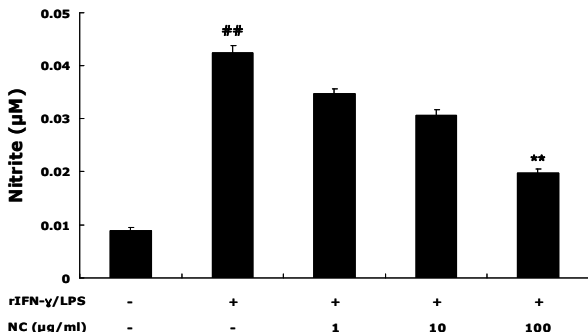


Fig. 5. Effects of NC on NO inhibition in rIFN- γ and LPS-stimulated peritoneal macrophages. NO (nitrite) released into the medium is presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments duplicate in each run; ## and ** represent statistically differences from control group and rIFN- γ + LPS treated group respectively (## $p < 0.001$, ** $p < 0.001$)

6. 쥐의 복강 대식세포에서 IFN- γ 와 LPS로 유도된 iNOS 발현에

대한 감송향의 억제 효과

염증반응 매개물질인 NO는 iNOS에 L-arginine으로부터 의해 생성되며 NO의 억제효과가 iNOS 발현 억제에 의한것인지 여부를 western blotting으로 조사하였다. 쥐의 복강 대식세포에 rIFN- γ 와 LPS를 투여하고 24시간 동안 배양한 결과 강하게 발현된 iNOS를 확인할 수 있었으며 감송향의 병용투여에 의해 iNOS는 농도의존적으로 현저히 감소하였고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 iNOS의 발현이 거의 확인되지 않았다(Fig. 6).

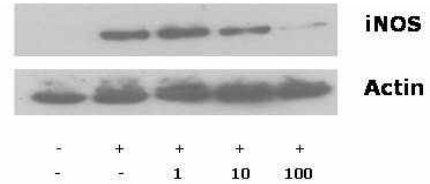


Fig. 6. Effects of NC on the expression of iNOS by rIFN- γ /LPS treated peritoneal macrophages. Blot showed results of cellular extracts for iNOS proteins following treating with NC (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of rIFN- γ /LPS stimulation or not for 24 h.

7. 쥐의 복강 대식세포에서 IFN- γ 와 LPS로 유도된 COX-2 발현에 대한 감송향의 억제 효과

또 다른 주요 염증 매개물질인 COX-2에 대한 감송향의 효과를 알아보기 위해서 쥐의 복강 대식세포를 rIFN- γ 와 LPS로 24시간동안 자극한 다음 western blotting으로 COX-2의 발현량을 확인하였다. 자극에 의해 COX-2의 발현량이 급격하게 증가된 것을 확인할 수 있었으며 감송향을 처리함에 따라 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

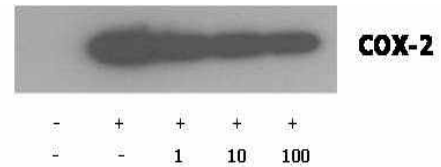


Fig. 7. Effects of NC on the expression of COX-2 by rIFN- γ /LPS treated peritoneal macrophages. Blot showed results of cellular extracts for COX-2 proteins following treating with NC (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of rIFN- γ /LPS stimulation or not for 24 h.

고 찰

중래의 합성의약품의 개발이 한계를 드러냄에 따라 전통약물인 한약을 포함한 천연물 유래의 의약품 개발이 활기를 띠고 있으며, 최근들어 활성산소 및 염증 관련 매개체들이 여러 질환의 발병에 밀접한 관련되어 있다고 알려지면서 항산화 및 항염증 물질을 찾는 노력이 계속되고 있다. 그러한 노력의 일환으로, 본 연구에서는 行氣止痛하는 효능으로胃痛, 胸腹脹滿, 頭痛 등에 사용되는 한약인 감송향의 항산화 및 항염증 효과를 알아보았다.

인간을 포함하여 호기성 호흡을 하는 모든 생물체들은 산소를 사용하여 물질대사가 이루어지며 이 과정에서 free radical이 발생하게 된다. free radical은 핵산 염기의 변형이나 결합의 절단 등으로 DNA의 손상을 가져오고, 아미노산을 산화시켜 단백질의

기능을 저하시키며 세포막의 불포화지방산을 과산화시켜 세포독성을 유발하는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 정상적인 상태에서는 free radical에 대한 자기방어기전이 효과적으로 작용하지만 여러 요인들에 의해 방어능력이 떨어지거나 free radical 생성이 증가하게 되면 산화적 스트레스 (oxidative stress)로 인해 조직의 손상과 질병으로 이어질 수 있다. 따라서 free radical의 생성을 억제하거나 직접 제거시키는 항산화제의 개발을 위한 연구가 많이 진행되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 감송향 85% 메탄올 추출물의 항산화 효과를 DPPH에 대한 전자공여능으로 측정하였다. DPPH는 안정한 유리기로서 전자공여체인 ascorbic acid나 phenolic 화합물 등에 의해 환원되어 탈색되는 성질이 있어 항산화능 측정에 많이 이용된다¹³⁾. 감송향의 항산화능은 항산화제로 잘 알려진 ascorbic acid를 대조군으로 하여 비교하였으며, 실험결과 감송향은 농도 의존적으로 radical 소거 활성을 나타내었고, 특히 1,000 µg/ml 농도에서 77.8%의 소거능으로 대조군인 ascorbic acid (10 mM)와 비슷한 효과를 보여주었다(Fig. 1).

산소를 이용하는 정상적인 대사과정에서 끊임없이 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)이 생성되며 그 중 가장 먼저 생성되는 것은 superoxide anion ($\bullet\text{O}_2$)으로서 정상적으로는 superoxide dismutase (SOD)에 의해 hydrogen peroxide로 전환된다. hydrogen peroxide는 catalase나 peroxidase 등에 의해서 물과 산소로 분해되면서 반응이 종결된다. 그러나 이러한 과정 중에 superoxide anion이 다른 ROS로 전환되어 세포 손상을 일으키며, 특히 hydrogen peroxide는 Fenton 반응에 의해 조직에 큰 상해를 입힐 수 있는 hydroxyl radical로 전환된다¹⁴⁾.

Xanthine oxidase는 xanthine이나 hypoxanthine을 산화시켜 uric acid를 생성하는 과정에서 superoxide anion을 생성하며, 생성된 superoxide anion은 nitroblue tetrazolium (NBT)와 반응하여 formazan을 형성하게 된다. 본 연구에서는 xanthine/xanthine oxidase에 의한 superoxide anion의 생성에 감송향이 어떠한 영향을 미치는지 NBT 환원방법을 통해 간접적으로 측정하였다. 실험결과 감송향은 농도 의존적으로 강한 superoxide 소거 활성을 보였으며, 1,000 µg/ml의 농도에서는 ascorbic acid와 효력이 유사하게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

염증반응에서는 ROS와 더불어 nitric oxide (NO), nitrous oxide (HNO_2), nitrogen dioxide (NO_2), peroxynitrite (ONOO⁻) 등의 활성질소종 (reactive nitrogen species; RNS)이 생성되며, 이 가운데 NO는 불안정한 기체 상태의 free radical로서 체내 여러 생리 및 병리적 환경에서 중요한 역할을 한다. 생리적 조건에서 NO는 종양이나 기생충, 세균 등의 방어에 관여하는 반면 과도하게 생성된 NO는 toxic radical로 작용하여 세포나 조직의 손상을 일으킨다¹⁵⁾.

한편 superoxide radical과 nitric oxide가 반응하여 생성되는 peroxynitrite는 여러 만성 질환의 병변과 관련되어 있음이 알려져 있다¹⁶⁾. 이에 peroxynitrite의 원인물질 가운데 하나인 nitric oxide에 대한 감송향의 소거능을 확인하기 위해서 sodium nitroprusside (SNP)에 의해서 생성된 nitric oxide를 Griess

reaction을 통해 정량하였다. 실험결과, 감송향 10, 100 µg/ml 처리군에서는 nitric oxide 소거능이 약한 반면 1,000 µg/ml 농도에서는 비교적 강한 소거활성을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이상에서 감송향은 peroxynitrite 생성에 관여하는 superoxide radical 및 nitric oxide 모두를 효과적으로 소거하였으며, 이를 통해 감송향이 peroxynitrite의 생성을 억제할 것으로 추측된다.

중요 염증 매개인자 가운데 하나인 NO에 미치는 감송향의 영향을 세포수준에서 확인하기 위해서 LPS로 자극된 쥐의 복강 macrophage를 사용하여 실험하였으며, 감송향은 LPS에 의해 약 4.5배 증가한 NO를 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 5). MTT assay를 통해 세포독성을 확인해 본 결과 감송향의 NO 생성 억제 효과가 세포독성에서 기인하지 않음을 알 수 있었으며(Fig. 4), in vitro 상의 NO 소거능이 세포에서도 유효하다는 것이 확인되었다.

NO의 생합성에 관여하는 효소인 NOS (nitric oxide synthase)는 생리적인 작용을 하는 constitutive NOS (cNOS)와 염증반응시 유도되어 장시간 다량의 NO를 생성하는 iNOS로 나눌 수 있다. LPS나 cytokine 등에 의해 유도된 iNOS에 의한 과량의 NO는 혈관투과성 증가, 부종 등의 염증반응을 촉진하고 염증 매개체의 생합성을 증가시켜 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다^{17,18)}. 이에 감송향의 macrophage에서의 NO 생성 억제 기전을 확인하기 위하여 immunoblotting을 통해 iNOS의 발현을 관찰하였다. 쥐의 복강 macrophage에서 LPS 자극에 의해 iNOS 발현이 현저히 증가하였으며, 감송향 투여에 의해 10, 100 µg/ml의 농도에서 iNOS의 발현이 감소하였다. 특히 100 µg/ml 농도에서는 iNOS의 발현이 전혀 확인되지 않았다(Fig. 6). 이러한 결과로 미루어보아 LPS로 자극된 macrophage에서 감송향의 NO 생성 저해는 iNOS 발현 억제에 기인한 것임을 확인할 수 있었다.

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins(PGs)로 전환하는 효소로서 혈소판의 형성, 위벽 보호 및 신장기능의 유지 등 정상적인 생리기능에 작용하는 COX-1과 염증매개물질인 PGE₂를 생성하는 COX-2로 분류된다¹⁹⁾. 많은 NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drug)들은 PGs의 합성 억제를 통해 효과를 나타내며 이는 주로 COX-2 활성 저해에 의한 것이다. 본 연구에서는 쥐의 복강 macrophage를 LPS로 자극하여 COX-2를 유도하여 감송향의 COX-2 활성 저해 정도를 immunoblotting을 통해 측정하였다. 실험결과, LPS 단독 처리군에 비해서 감송향 투여군은 iNOS와 마찬가지로 COX-2의 발현을 저해함을 알 수 있었다(Fig. 7).

Yoshiaki 등은 포르말린을 이용한 통각실험에서 감송향에서 분리한 nardoguaianone A 및 D가 진통효과가 있다고 보고하였다²⁰⁾. 포르말린시험은 1상 반응과 2상 반응으로 나눌 수 있으며 그 기전이 각각 다른데 1상 반응은 1차 구심성 섬유가 짧은 시간 동안 직접적으로 활성화되어 나타나며 급성통증을 반영하는 반면, 2상 반응은 PGs 생성 증가²¹⁾ 등에 의한 말초조직의 염증반응으로 인해 통증이 강화되어 지속적으로 나타나는 만성성 통증 상태를 나타낸다²²⁾. Yoshiaki 등의 보고에 따르면 감송향은 1상 반응에는 영향을 주지 않았으며 2상 반응에서 항통각효과를 보여주었는데, 이는 감송향이 염증성 매개물질 감소를 통해서 진통

효과를 보인 것으로 해석할 수 있으며, 감송향의 항염증 효과를 확인한 본 실험의 결과와 부합된다고 생각된다.

본 실험 결과를 요약하면, 감송향 85% 메탄올 추출물은 *in vitro* 에서 강한 항산화 활성이 확인되었으며, LPS로 자극된 쥐의 복강 macrophage에서 염증성 매개물질인 NO의 생성이나 iNOS, COX-2 등의 발현을 억제하였다. 이상의 실험 결과들로 감송향이 동맥경화나 관절염 등의 산화적 스트레스와 관련이 있는 만성 염증성 질환의 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 본 연구가 감송향의 항산화 및 항염증 성분의 분리 및 기전 연구에 기초자료가 되었으면 한다.

결 론

감송향의 85% 메탄올 추출물의 항산화능을 측정하기 위해 *in vitro* 상에서 DPPH radical과 ROS의 일종인 superoxide anion 및 RNS의 일종인 nitric oxide 소거 활성을 알아본 결과 감송향은 세가지 모두에서 뚜렷한 소거활성을 나타내었다. 또한 감송향의 항염증 효과를 알아보기 위해서 쥐의 복강 대식세포를 LPS로 활성화시킨 후 NO의 생성량 및 iNOS와 COX-2의 발현량에 미치는 영향을 살펴보았다. 감송향은 LPS에 의해 생성된 NO를 유의성 있게 감소시켰으며 이는 감송향의 세포독성에서 기인한 것이 아님을 확인할 수 있었다. 또한 감송향에 의해 iNOS와 COX-2의 발현 역시 억제됨이 관찰되었다. 이러한 결과로 보아, 감송향의 메탄올 추출물은 우수한 항산화 및 항염증 효과를 가지고 있는 것으로 판단되며, 만성 염증성 질환의 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구임 (지역거점연구단육성사업/헬스케어기술개발사업단) 및 우석대학교 교내 연구비 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

- Aniya, Y., Naito, A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem Pharmacol* 45(1):37-42, 1993.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85, 1990.
- Shahidi, F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44(3):158-163, 2000.
- 全國韓醫科大學本草學教授. 本草學. 서울, 永林社, pp 367-368, 2003.
- Han, Y., Xiao, D., Xiang, Y., Ye, L., Cheng, C. Study on the volatile oil of *Nardostachys chinensis*. *Zhong Yao Cai* 23(1):34-35, 2000.
- Li, P., Matsunaga, K., Yamamoto, K., Yoshikawa, R., Kawashima, K., Ohizumi, Y. Nardosinone, a novel enhancer of nerve growth factor in neurite outgrowth from PC12D cells. *Neurosci Lett* 273(1):53-56, 1999.
- Li, P., Yamakuni, T., Matsunaga, K., Kondo, S., Ohizumi, Y. Nardosinone enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in a mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent manner in PC12D cells. *J Pharmacol Sci* 93(1):122-125, 2003.
- Itokawa, H., Masuyama, K., Morita, H., Takeya, K. Cytotoxic sesquiterpenes from *Nardostachys chinensis*. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 41(6):1183-1184, 1993.
- Takaya, Y., Takeuji, Y., Akasaka, M. Novel Guaiane Endoperoxides, Nardoguaianone A-D, from *Nardostachys chinensis* Roots and their Antinociceptive and Antimalarial Activities. *Tetrahedron* 56(39):7673-7678, 2000.
- Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana - *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General pharmacology* 32(6):661-667, 1999.
- Ibrahim, H.R., Hoq, Md.I., Aoki, T. Ovotransferrin possesses SOD-like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding. *Int J Biol Macromol* 41(5):631-640, 2007.
- Kellogg, E.W.3rd., Fridovich, I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 252(19):6721-6728, 1977.
- Cheng, Z.J., Kuo, S.C., Chan, S.C., Ko, F.N., Teng, C.M. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta* 1392(2-3):291-299, 1998.
- 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 compounds. *J Agric Food Chem* 48(11):5338-5342, 2000.
- Nakagawa, T., Yokozawa, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol* 40(12):1745-1750, 2002.
- Lin, K.T., Xue, J.Y., Sun, F.F., Wong, P.Y. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 230(1):115-119, 1997.
- Ryu, J.H., Ahn, H., Kim, J.Y., Kim, Y.K. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytother Res* 17(5):485-489, 2003.
- Mu, M.M., Chakravorty, D., Sugiyama, T., Koide, N., Takahashi, K., Mori, I., Yoshida, T., Yokochi, T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-

- induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res* 7(6):431-438, 2001.
19. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(25):12013-12017, 1994.
 20. Takaya, Y., Takeuji, Y., Akasaka, M., Nakagawasai, O., Tadano, T., Kisara, K., Kim HS., Wataya, Y., Niwa, M., Oshima, Y. Novel Guaianes Endoperoxides, Nardoguanone A-D, from *Nardostachys chinensis* Roots and their Antinociceptive and Antimalarial Activities. *Tetrahedron* 56(39):7673-7678, 2000.
 21. Malmberg, A.B., Yaksh, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 15(4):2768-2776, 1995.
 22. Puig, S., Sorkin, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 64(2):345-355, 1996.