

혈관내피세포에서 토복령(土茯苓)의 항산화 및 항염증 효과

이창현², 이효승^{1,2}, 김재은¹, 허숙경², 차창민², 원찬욱², 박선동^{1,2,*}

1: 심혈관계질환 천연물 연구개발센터 2: 동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Fractionated Extracts of Smilacis Glabrae Rhizoma in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

Chang-Hyun Lee², Hyo-Seung Yi^{1,2}, Jae-Eun Kim¹, Sook-Kyoung Heo²,
Chang-Min Cha², Chan-Wook Won², Sun-Dong Park^{1,2,*}

1: Cardiovascular Medical Research Center, Dongguk University

2: Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : Smilacis glabrae rhizoma (SG) has been traditionally used as a herbal medication of musculoskeletal disorders like arthritis, pain, convulsions, and syphilis in traditional Korean medicine. This study was investigated anti-oxidative and anti-inflammatory effect of fractionated extracts of Smilacis Glabrae Rhizoma in Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC).

Methods : SG extract prepared with methanol, and then fractionated with hexane, dichloromethane, ethylacetate, n-butanol and water. Inhibitory effect of SG onto free radical generation was determined by measuring DPPH, superoxide anions and nitric oxide scavenging activities *in vitro*. Cytotoxic activity of extracts on RAW 264.7 cells was measured using 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. Intracellular oxidation was analysed by DCF-DA assay. The nitric oxide (NO) production was measured by Griess reagent system. The levels of ICAM-1 and VCAM-1 expression were confirmed by western blot. And proinflammatory cytokines were measured by ELISA kit.

Results : Our results indicated that fractionated extracts, especially ethyl acetate (EA) extract, significantly inhibited free radical generation, the TNF- α -induced intracellular oxidation. Furthermore, the EA extract protected TNF- α -induced adhesion to THP-1, expression of adhesion molecules accompanied by an attenuation of IL-6 and IL-8 formation in HUVEC.

Conclusions : These results indicate that EA extract of SG have potential as an agent of atherosclerosis and other chronic inflammatory diseases including diabetes, hypertension, and arthritis.

Key words : Smilacis glabrae rhizoma (SG), anti-oxidation, anti-inflammation, chronic inflammatory

서 론

죽상동맥경화증 (atherosclerosis)은 죽상판 또는 섬유 지방판을 형성하여 혈관의 내강을 좁히고, 중막을 약화시

켜 각종 합병증을 유발한다. 죽상경화증은 특히 대동맥, 심장동맥 및 대뇌의 동맥에 흔해서 심장근육경색, 대뇌경색 및 대동맥 동맥류 등의 합병증을 초래한다. 뿐만 아니라 동맥혈류를 감소시켜서 팔다리의 괴저, 장간막 혈관폐

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

· Tel : 054-770-2371 · E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

· 접수 : 2009년 8월 12일 · 수정 : 2009년 9월 15일 · 채택 : 2009년 9월 23일

쇄로 인한 장경색증, 급성 심장사, 만성 허혈성 심장질환, 뇌혈관장애질환 등을 유발한다¹⁾.

동맥경화를 일으키는 중요한 위험 요소로 알려진 것은 고혈압, 고지혈증, 흡연 등을 들 수 있으며, 이 외에도 지방과 염분의 과다섭취, 과식, 운동부족, 스트레스, 당뇨병 등이 위험인자로 작용한다. 이러한 위험 인자들이 동맥경화를 유발시키기까지의 분자 생물학적인 발생기전은 2000년까지도 잘 알려지지 않은 상태였지만, 최근에 많은 연구 결과들이 나오면서 원인에 대한 분자 생물학적인 기전들이 밝혀지고 있고 치료제에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다²⁾. 그 중에서도 혈관 내피의 산화적인 손상과 분자염증 반응에 대한 관심이 높는데, 혈관 내피의 산화적인 손상은 혈관의 염증을 유발시키고, 단핵구가 혈관의 내피에 부착하게 되는 것은 동맥경화의 발단이 된다는 점에서, 혈관 내피는 동맥경화의 발생 기전에 있어서 중요한 장소라 할 수 있다³⁾. 단핵구와 혈관 내피세포 사이의 관계는 세포부착인자인 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) 등에 의해서 조절되는데, 염증이 발생하게 되면 이들 부착인자의 발현이 증가되고, 혈관 내피로 부착된 단핵구가 유주하면서 동맥경화가 진행하게 된다⁴⁾.

토복령(土茯苓)은 백합과 식물 토복령(*Smilacis glabrae* Rhizoma, SG)의 뿌리줄기이다. 한방에서는 토복령이 해독작용이 강하고, 濕을 제거하며 관절질환에 이롭다하여 매독, 淋濁, 근골 경련·동통, 脚氣, 癰腫, 瘰癧 등에 사용하여 왔다⁵⁾. 최근에 태국을 비롯한 동남아시아 국가들에서는 암과 에이즈의 치료제로서 토복령을 사용하고 있다는 흥미로운 보고도 있다⁶⁾. 토복령의 성분에 대한 연구는 아직까지 많지 않은데 saponin, tannin 등이 주성분이라고 알려져 있다⁷⁾. 토복령의 약리 활성과 치료 효과에 대해서 연구된 결과들을 살펴보면, 먼저 관절염을 유발시킨 마우스 모델에서 토복령 추출물이 유효한 효과를 보인다는 보고가 있었고^{8,9)}, 간손상에 대한 보호 효과^{10,11)}, 항산화 및 항균 활성에 대한 연구도 되어 있다. 토복령을 약침액으로 제조해서 HgCl₂ 중독 흰쥐의 신장 손상을 보호하는 동물 실험 연구도 있었다¹²⁾.

그러나 토복령의 혈관내피세포에 대한 항산화 및 항염증 효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 토복령을 메탄올을 추출하고 그 추출물을 네 가지 유기용매로 획분하여 각각의 항산화 활성을 *in vitro*상에서 비교한 다음, 그 중에서 뛰어난 활성을 지닌 획분층을 선택했다. 그리고 선택된 층은 혈관내피세포에 대한 항산화 및 항염증 활성을 조사하기 위하여 사람의 정맥내피세포인 HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)에 TNF- α (tumor necrosis factor- α)를 처리하여 산화손상과 염증반응을 유도시켜서, 약제가 이를 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는지 관찰하였다. 그리고 TNF- α 를 사용하여 사람의 단핵구 세포인 THP-1와 HUVEC과의 부착 (adhesion)을 유발시키고 약제가 실질적으로 두 세포의 부착을 효과적으로 방어하는

지도 관찰했다. 그 결과 유효한 효과를 얻었기에 동맥경화의 예방 및 치료제로서 토복령의 가능성을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 토복령 (*Smilacis glabrae* Rhizoma, SG)은 450 g에, 5,000 ml의 100% methanol을 가한 다음 72°C에서 48시간 동안 추출하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 114 g의 메탄올 추출물(수율 25.3%)을 얻었다. 이 메탄올 추출물은 Fig. 1에서와 같이 용매분획하였다.

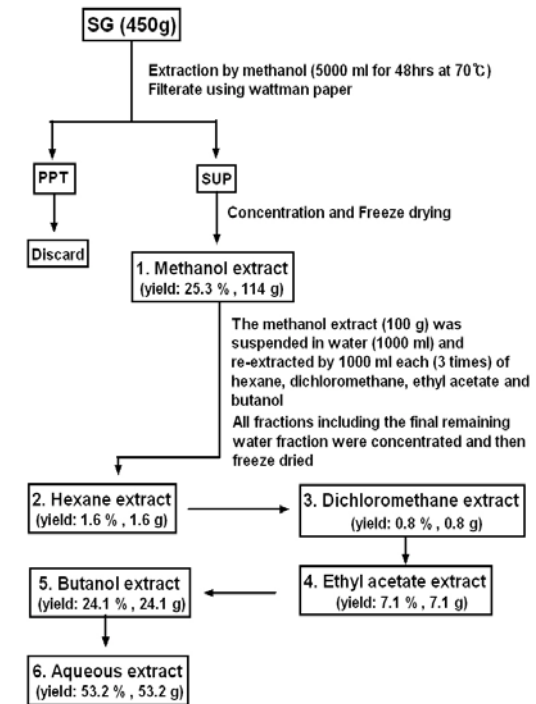


Fig. 1. Extraction and fractionation procedures of MT

2) 시약

세포 배양액인 endothelial cell basal medium-2 (EBM-2)는 Cambrex사(Walkersville, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 Sodium Dodesyl 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), 4,5-diaminofluorecein (DAF-2), 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA),

CAPS, tween 20, protease inhibitors 등은 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였고, BCECF-AM (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein)은 molecular probes사(Eugene, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 ICAM-1, VACM-1 monoclonal antibody (mAb)는 Santa Cruz Biotechnology사(CA, USA)에서 β -actin mAb는 Cell Signaling Technology사(Beverly, USA)에서 구입하였다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody와 anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit는 Promega사(Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정을 위한 ELISA kit는 Pierce Biotechnology사(Rockford, USA)에서 구입하였으며, Protein assay reagent는 Bio-Rad사(Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) Free radical 소거활성 측정

(1) DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Gyamfi 등¹³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 먼저 토복령 획분 총별 시료 50 μ l에 0.1 mM DPPH 용액 1 ml과 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 450 μ l를 가하여 잘 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 30분간 정치한 다음, micro plate reader (VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 파장 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical의 소거활성은 50%의 소거능을 보이는 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

(2) Superoxide anions 소거활성 측정

Superoxide anions 소거활성은 Gotoh와 Niki¹⁴⁾의 방법을 사용하여 측정하였다. 먼저 획분 총별 시료 30 μ l에 30 mM EDTA (pH 7.4) 100 μ l, 30 mM hypoxanthine 10 μ l, 1.42 mM NBT 200 μ l를 가한 다음 실온에서 3분 반응시킨 후에, 0.5 U/ml xanthine oxidase 100 μ l를 첨가하고 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 총 용량을 3 ml로 맞췄다. 반응용액을 실온에서 20분간 배양시킨 후, 560nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 결과는 superoxide radical에 의한 NBT reduction의 IC₅₀값으로 환산하여 표시하였다.

(3) Nitric oxide 소거활성 측정

Nitric oxide의 소거활성은 Sutherland 등의 방법¹⁵⁾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. 획분 총별 시료 10 μ l를 50 mM phosphate

buffer (pH 7.4) 130 μ l와 혼합한 다음, 40 mM SIN-1 10 μ l 및 DAF-2 용액 50 μ l를 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 10분간 배양한 다음, DAF-2와 nitric oxide (NO)의 반응에 의해 생성되는 triazolofluorescein의 형광강도를 fluorescence microplate reader (GENios-basic, TECAN, Austria)를 사용하여, excitation 파장 495 nm 및 emission 파장 515 nm에서 측정하였다.

2) 세포배양

사람의 제대정맥내피세포인 human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC)은 MCTT (MC1133, Seoul, Korea)로부터 구입하였으며, 세포배양을 위해 Cambrex 사(Walkersville, USA)에서 구입한 endothelial cell basal medium-2 (EBM-2) 배지를 사용하였다. 사람의 monocytoid cell line인 THP-1은 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) MTS assay

토복령 ethyl acetate (EA) 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법¹⁶⁾으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 HUVEC 세포를 분주하고 약제를 농도별 (0, 10, 20, 40, 50, 70, 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) DCF-DA assay

토복령 EA 추출물이 H₂O₂와 TNF- α 에 의한 HUVEC 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA assay를 실시하였다^{17,18)}. 먼저 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하고, 약제를 농도별(20, 50 μ g/ml)로 처리하고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음, phosphate-buffered saline (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 485nm와 emission 파장 535nm에서 형광강도를 측정하였다. DCF 형광강도의 증가율은 대조군과 비교해서 배수(fold)로 계산하였다. TNF- α 처리군의 경우는 약

제를 처리하고 1시간 배양 후에, 10 ng/ml의 TNF- α 를 가한 다음, 18시간을 배양해서 DCF 형광강도를 측정하였다.

5) Cell adhesion assay

토복령 EA 추출물이 HUVEC과 THP-1 세포의 adhesion에 미치는 영향을 측정하기 위해서 cell adhesion assay를 실시하였다¹⁹⁾. 96-well plate를 사용해서 HUVEC에 토복령 EA 추출물을 농도별(20, 50 μ g/ml)로 1시간 전처리하고, 10 ng/ml의 TNF- α 를 처리해서 18시간 배양하였다. THP-1 세포는 10 μ M BCECF-AM을 배양액에 희석해서 1시간 동안 배양하고, PBS buffer로 세 번 washing 한 뒤, 원심분리기를 이용해 모았다. 그리고 이를 배지에 suspension해서 HUVEC에 넣어서 1시간 동안 함께 배양하였다. 부착이 이루어지지 않은 세포를 제거하기 위해서 PBS buffer로 세 번 washing하고, fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 BCECF 형광강도를 측정하였다.

6) 유세포 분석기를 이용한 부착분자 발현율 측정

HUVEC 세포에 10 ng/ml의 TNF- α 와 토복령 EA 추출물을 농도별(20, 50 μ g/ml)로 처리하고 18시간 배양 후 세포를 회수하여 FACS buffer (0.2% BSA-PBS)로 2번 washing하였다. 각각의 sample에 PE anti-human ICAM-1 mAb 및 PE anti-human VCAM-1 mAb (Pharmingen, San Diego, USA)을 1 μ l씩 첨가하여 Vortex Mixer로 섞어준 다음, 암실에서 30분간 반응시킨 후 FACS buffer로 2회 washing 하였다. 500 μ l의 FACS buffer를 가하여 Vortex Mixer로 잘 섞어 준 후 유세포 분석기(Becton Dickinson, USA)로 분석하였다²⁰⁾.

7) 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. 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 검출 단백질에 대한 항체(anti-VCAM-1, anti-ICAM-1)를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST (tris-buffered saline-tween 20) 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL (electrochemical luminiscence) system으로 반응 시킨 후

X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

8) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 세포에 토복령 EA 추출물을 처리하고 1시간 후 10 ng/ml의 TNF- α 를 처리하였다. 18시간 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 benzalmonate (TMB) substrate를 100 μ l씩 처리하여 5~30분간 반응시킨 후 100 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

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

실험 결과

1. 토복령 획분층의 free radical 소거활성 측정

1) DPPH radical 소거활성 측정

토복령의 메탄올 추출물과 그 획분 층별 추출물 간의 전자 공여능을 비교하기 위하여, DPPH radical에 대한 소거활성을 측정하였다. 본 실험의 결과 토복령의 메탄올 추출물의 경우 22.02 μ g/ml의 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였고, 획분층의 경우 hexane층은 76.72 μ g/ml, dichloromethane 층은 31.25 μ g/ml, ethyl acetate 층은 14.95 μ g/ml, butanol 층은 22.56 μ g/ml 그리고 aqueous 층은 42.34 μ g/ml의 농도에서 50%의 radical을 소거하였다(Fig. 2A). 따라서 토복령의 획분층 중에서 ethylacetate 층이 가장 우수한 전자 공여능을 갖고 있음을 알 수 있었다.

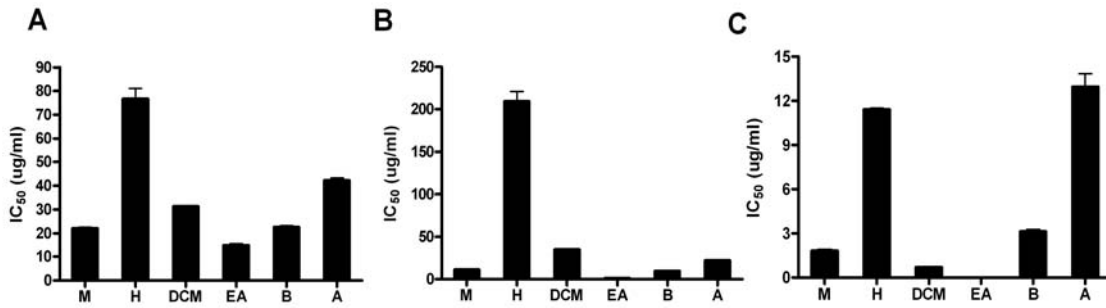


Fig. 2. Scavenging activities of fractionated SG extracts on various free radicals

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. M : methanol extract. H : hexane extract. DCM : dichloromethane extract. EA : ethyl acetate extract. B : butanol extract. A : aqueous extract.

2) Superoxide anions 소거활성 측정

대표적인 활성산소종(reactive oxygen species)의 하나인, superoxide radical에 대한 소거활성의 경우에는, 메탄올 추출물의 경우 11.56 µg/ml의 농도에서 50%의 소거활성을 보였고, hexane추출물의 경우 209.46 µg/ml, dichloromethane추출물은 35.15 µg/ml, ethyl acetate추출물은 1.64 µg/ml, butanol추출물은 9.90 µg/ml, 그리고 aqueous추출물은 22.35 µg/ml의 농도에서 50%의 소거능을 보였다(Fig. 2B). 본 실험의 결과 토복령의 hexane추출물 중에서 가장 우수한 활성산소종 소거활성을 지닌 것은 DPPH radical 소거활성 실험결과와 같은, ethylacetate 추출임을 알 수 있었다.

3) Nitric oxide 소거활성 측정

활성질소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 nitric oxide (NO)에 대한 토복령 hexane추출물의 소거효과를 *in vitro*상에서 관찰하기 위하여, SNP를 사용하여 NO의 생성을 유도하고, 이로 인해 생성되는 DAF-2의 형광강도를 측정하였다. 그 결과 메탄올 추출물의 경우 1.82 µg/ml의 농도에서, hexane추출물의 경우 11.41 µg/ml, dichloromethane추출물은 0.70 µg/ml, ethyl acetate추출물은 0.01 µg/ml, butanol추출물은 3.14 µg/ml, 그리고 aqueous추출물은 12.96 µg/ml의 농도에서 50%의 소거활성을 보였다(Fig. 2C). 따라서 토복령의 hexane추출물 중에서 ethylacetate추출물이 아주 우수한 NO 소거활성을 지니고 있다고 판단할 수 있었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, DPPH radical, 활성산소종과 활성질소종 소거활성이 모두 뛰어난 추출물은 ethylacetate 추출이라는 결론을 내릴 수 있었고, 이 추출물을 선별하여 HUVEC 세포에서 실험을 진행하였다.

2. 토복령 EA 추출물의 HUVEC 세포에 대한 독성

HUVEC에 대한 약제의 세포독성을 알아보기 위하여

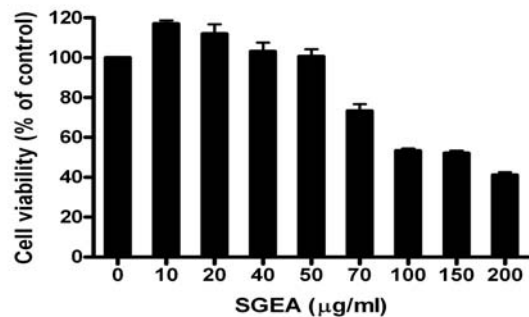


Fig. 3. Effect of SGEA extracts on the cell viability of HUVEC cells

HUVECs were treated with various concentrations (0, 10, 20, 40, 50, 70, 100, 150, 200 µg/ml) of SGEA 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.

MTS assay를 수행하였다. 토복령 EA 추출물(SGEA)을 농도별(0, 10, 20, 40, 50, 70, 100, 150, 200 µg/ml)로 18시간 동안 처리한 결과, 50 µg/ml의 농도까지는 독성이 나타나지 않았지만, 그 이상의 농도에서는 세포의 생존율을 20% 이상 감소시켰다(Fig. 3). 따라서 SGEA가 HUVEC의 세포 생존율에 영향을 주지 않는 50 µg/ml 이하의 농도(20, 50 µg/ml)로 다음 실험을 진행하였다. 이는 토복령 추출물이 보여주는 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약제들의 고유한 특성임을 뜻한다.

3. HUVEC 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과

H₂O₂와 TNF-α에 의한 HUVEC 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 검토하였다. 먼저 HUVEC 세포에 20, 50 µg/ml의 SGEA 추출물을 전 처리한 다음, H₂O₂와 TNF-α로 세포의 산화적 손상을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과 잘 알려진 산화제이고 DCF에 의해 직접적으로 포집되는

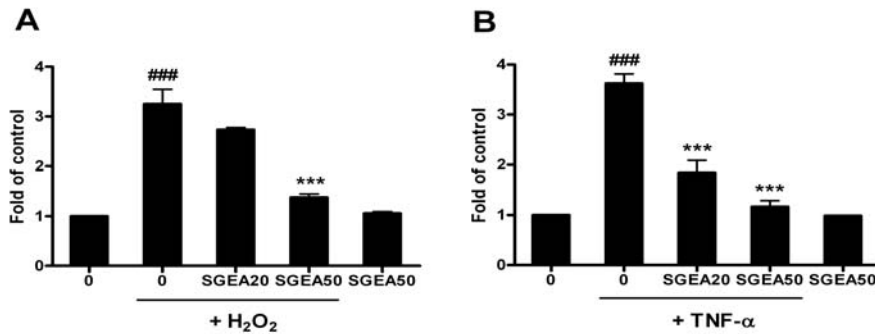


Fig. 4. Inhibitory effect of SGEA extracts on intracellular oxidation in HUVEC induced by H₂O₂ and TNF-α

HUVECs were preincubated with 20 and 50 μg/ml of SGEA extract for 18 hr. Four mM H₂O₂ were treated to induce intracellular oxidation (A). Cells were preincubated with 20 and 50 μg/ml of EA extract for 1 hr and then treated with 10 ng/ml of TNF-α for 18 hr to induce intracellular oxidation (B). The increase of DCF fluorescence was calculated at increasing fold of control. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or H₂O₂ alone (*); ### *** : p < 0.001.

H₂O₂를 단독 처리한 군에서는 약 3.3배의 형광강도 증가를 보인 반면, SGEA를 전처리한 군에서 20 μg/ml 처리군에서는 2.7배, 50 μg/ml 처리군에서는 1.4배의 증가를 보여서 농도 의존적인 산화 손상 억제 효과를 보였다. 토복령 추출물만 단독 처리한 군에서의 산화적인 손상은 관찰되지 않았다(Fig. 4A).

TNF-α의 단독 처리에 의해서도 세포의 산화적 손상이 효과적으로 유도됨을 알 수 있었는데, TNF-α 단독 처리군의 경우, 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 3.6배 정도로 형광강도가 증가했다. 반면 SGEA 20 μg/ml 처리군에서는 1.9배, 50 μg/ml 처리군에서는 1.2배의 증가를 보여서 역시 농도 의존적인 산화 손상 억제 효과를 보였고, H₂O₂를 처리해서 산화를 유발시킨 경우보다 억제 효과도 더 좋았다. 토복령 추출물 단독으로는 산화적 손상을 유발하지 않았다(Fig. 4B).

4. TNF-α로 유도된 HUVEC과 THP-1 세포의 adhesion에 미치는 영향

TNF-α에 의해 유발되는 HUVEC과 THP-1 세포의 adhesion에 미치는 영향을 살펴보기 위해 adhesion assay를 실시하였다. TNF-α를 단독 처리한 HUVEC은 아무런 처리를 하지 않은 군보다 2배 정도 높은 형광강도의 증가를 보임으로써 TNF-α의 처리가 효과적으로 adhesion을 일으켰음을 알 수 있었다. 반면 SGEA 20 μg/ml 처리군에서는 42%, 50 μg/ml 처리군에서는 94%의 adhesion 억제율을 보여서 농도 의존적으로 아주 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다. SGEA 단독으로는 adhesion을 유발하지 않았다(Fig. 5).

5. HUVEC에서 VCAM-1과 ICAM-1의 발현에 미치는 영향

HUVEC에 SGEA를 농도별로 1시간 전처리하고 10

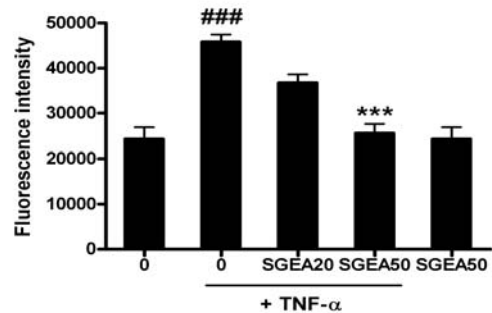


Fig. 5. Effect of SGEA extract on adhesion of THP-1 cells to HUVEC, stimulated with TNF-α

HUVECs were preincubated with 20 and 50 μg/ml of EA extract for 1 hr and then treated with 10 ng/ml of TNF-α for 18 hr to induce adhesion. The increase of BCBCF fluorescence was measured by fluorescence microplate reader. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or TNF-α alone (*); ### *** : p < 0.001.

ng/ml의 TNF-α를 18시간 동안 처리하여 부착분자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

먼저 유세포 분석기를 이용하여 세포내 VCAM-1, ICAM-1의 발현양상을 조사해 보았다. 그 결과 HUVEC에 10 ng/ml의 TNF-α를 처리하였을 때 VCAM-1의 발현이 크게 증가하였고, 증가된 VCAM-1은 농도 의존적으로 감소되었다. 특히 50 μg/ml의 농도에서는 80% 이상의 발현 억제 효과를 보였고, 토복령 단독으로는 발현에 아무런 영향을 주지 않았다(Fig. 6A). ICAM-1의 경우도 10 ng/ml의 TNF-α를 처리했을 때, 발현이 크게 증가한 반면, SGEA에 의해서는 20, 50 μg/ml의 농도에서 각각 81%, 94%의 아주 높은 발현 억제 효과를 보였다. 토복령 단독으로는 역시 발현에 아무런 영향을 주지 않았다(Fig. 6B).

Western blot를 통해서도 VCAM-1과 ICAM-1의 발현에 미치는 영향을 확인해 보았다. 그 결과 TNF-α의 처리는 VCAM-1과 ICAM-1의 발현을 유도시켰고, 토복령

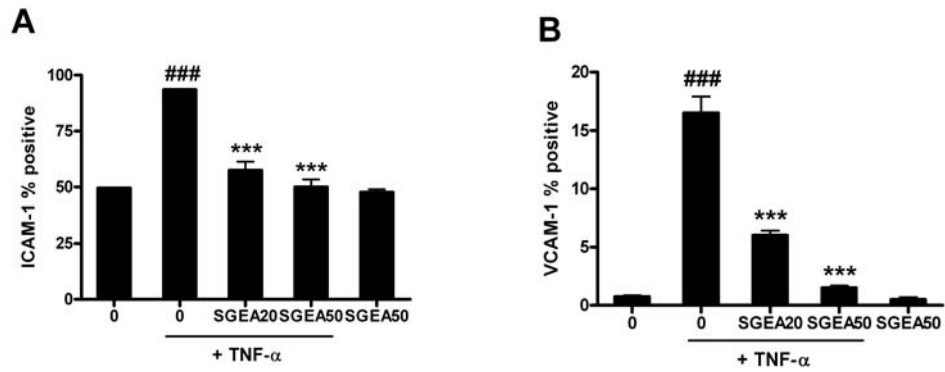


Fig. 6. Inhibitory effect of SGEA extract on TNF- α -induced VCAM-1 (A) and ICAM-1 (B) expression in HUVEC. Cells were treated with TNF- α (10 ng/ml) and 20, 50 μ g/ml of SGEA extract for 18 hr. The levels of VCAM-1 (A) and ICAM-1 (B) expression were measured by flow cytometer. Significantly different from control (#) or TNF- α alone (*); ### *** : $p < 0.001$.

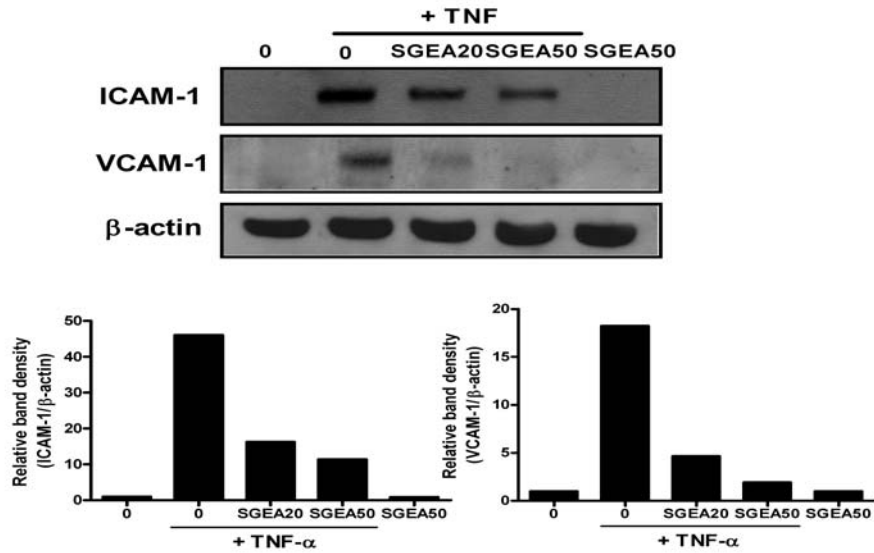


Fig. 7. Inhibitory effect of SGEA extract on TNF- α -induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in HUVEC. Cells were treated with TNF- α (10 ng/ml) and 20, 50 μ g/ml of SGEA extract for 18 hr. The levels of VCAM-1 and ICAM-1 protein expression were measured by western blot assay. β -actin levels were used as a loading control. The density of band was calculated by GelDoc-It Biolmaging System.

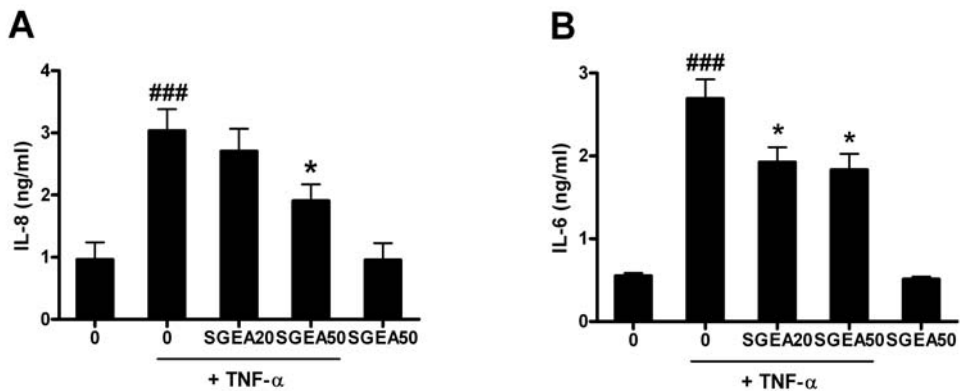


Fig. 8. Inhibition of TNF- α -induced IL-8 and IL-6 by SGEA extract. The cells were preincubated with 20, 50 μ g/ml of SGEA extract for 1 hr, respectively and then treated with 10 ng/ml of TNF- α for 18 hr. The IL-8 and IL-6 production were measured by ELISA as described in materials and methods. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or TNF- α alone (*); ### *** : $p < 0.001$, * : $p < 0.05$.

추출물은 모두 농도 의존적으로 부착분자들의 발현을 효과적으로 억제시킴을 알 수 있었다(Fig. 7).

6. 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향

염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)은 염증을 나타내는 중요한 지표이다. 토복령이 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 HUVEC에 SGEA를 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 10 ng/ml의 TNF- α 를 18시간 동안 처리하고 상등액을 수거하여 IL-8과 IL-6의 생성량을 조사하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 IL-8의 생성량이 약 3.2배 증가하였고, 이는 SGEA 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에 의해서 각각 15.8%, 54.3% 감소되었다(Fig. 8A). 또한 TNF- α 에 의해 IL-6의 생성량은 약 4.9배 증가하였고, 이는 SGEA 20, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 35.8%, 40.3%로 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 8B). 이 결과 토복령 EA 추출물은 TNF- α 로 유도된 proinflammatory cytokines을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

고찰

동맥경화의 발생 기전에 대해서 최근에 주목받고 있는 것은 크게 손상에 대한 반응가설과 산화적 스트레스에 의한 가설, 두 가지가 있다. 먼저 손상에 대한 반응가설(reaction to injury hypothesis)은 죽상동맥경화증이 손상에 대한 반응으로 시작된다는 것으로 염증반응과 밀접한 관련이 있는데, 특히 혈관내피세포(vascular endothelial cell)와 평활근세포(smooth muscle cell)에서 두드러지게 나타난다²¹. 혈관에 손상 부위가 생기면, 지질을 포함한 혈장 성분의 투과성이 증가하고, 내피세포에 혈소판과 단핵구가 부착한다. 부착된 단핵구는 혈관내피 내로 들어가서 지질을 탐식하여 포말세포(foam cell)가 된다. 활성화된 혈소판 또는 단핵구로부터 유리된 인자는 평활근세포를 중막에서 내막으로 이동(migration)시키고 증식(proliferlation)하도록 한다. 그리고 평활근 세포에 의한 세포외 기질의 합성으로 교원질, 탄력섬유 그리고 프로테오글리칸의 축적을 일으킨다. 단일 손상 혹은 일정 기간 동안의 손상은 내피세포의 재생, 기능의 회복, 그리고 병소의 복구로 이어지므로 문제가 되지 않지만, 손상이 반복되거나 만성적일 경우에는 지속적으로 혈관의 투과성이 증가하고, 침윤한 단핵구와 혈소판의 상호작용에 의해 죽상판도 지속적으로 형성된다. 이 과정은 병리학적인 관찰에 의해서도 확인되었는데, 실제로 죽상동맥경화반 내에서 무수히 많은 염증세포들이 발견되기 때문이다. 즉 단핵구를 위시하여 대식세포와 T 림프구 등의 침윤이 관찰된다. 체내의 다른 염증과 마찬가지로 이들 염증 세포들은 혈류에서 이동되어 침착된 것들인데, 염증세포들이 혈관벽 내로 이

동하는 과정은 rolling - firm adhesion - transmigration의 세 단계로 나누어져 있다. 정상 혈관 내피세포들은 염증세포와의 상호작용이 일어나지 않는다. 그러나 혈관이나 혈관벽 내에 염증이 발생하였을 경우에는 염증세포가 혈관벽에 달라붙기 시작한다. 이 단계에서 염증세포는 혈관벽 위를 슬슬 굴러가는 모습을 보이는데, 이를 'rolling' 현상이라고 부른다. 염증반응이 지속되면 혈관벽의 내피세포에서 adhesion molecule이라고 지칭되는 VCAM-1, ICAM-1 등이 발현하게 되고, 이들이 염증세포에 있는 integrin이라는 수용체와 상호작용을 하게 된다. 이는 염증세포와 혈관내피와의 매우 강한 결합을 유도하여 염증세포가 더 이상 혈관 위를 굴러가지 않고 혈관벽 위에 강력하게 달라붙게 된다. 이를 'firm adhesion'이라고 부른다. 혈관벽 위에 부착된 단핵구 등의 염증세포는 혈관내벽을 통과하여 서서히 혈관벽 안으로 이동하게 되고 이를 'transmigration'이라고 부른다. 염증세포를 유도하여 혈관 내로 이동시키는 물질은 cytokine의 일종으로, 염증세포의 방향성 있는 운동(chemotaxis)을 유도한다고 하여 이를 chemokine (chemotaxis +cytokine)이라는 합성어로 지칭하고 있다. 가장 많은 연구가 이루어진 chemokine으로는 단핵구의 주화성 운동을 주로 유발하는 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)이 있다. 혈관 내로 이동한 단핵구는 혈관벽 안의 염증반응에 의하여 대식세포로 분화를 일으키고, foam cell로 변화하여 더욱 강력한 염증 반응을 일으키는 주체가 된다²².

또한 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의한 가설을 살펴보면 다음과 같다. 우리 몸은 항상성 유지를 위해 산화촉진물(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)들이 균형을 이루고 있는데, 이 균형이 깨져서 산화 촉진 쪽으로 기울게 되면 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, 류마티스 관절염, 백내장, 노인성 치매, 파킨슨씨병과 같은 질환 등을 유발시킨다²³. 특히 동맥경화의 경우에는 죽상동맥경화의 위험인자들로 알려진 것들이 공통적으로 혈관세포 내 산화 스트레스(oxidative stress)를 증가시키고, 이에 따라 2차적으로 redox-sensitive signaling pathway와 transcription factor를 활성화함으로써 혈관세포와 면역세포의 상호작용에 의한 염증을 유발하고, 혈관기능의 장애를 초래하여 결국 죽상동맥경화를 유발한다고 알려져 있다²⁴. 동맥경화의 발생에 산화적 스트레스가 중요한 역할을 한다는 사실은 많은 연구 결과들이 증명해 주고 있는데, 생체 내에서 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등의 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)과 nitric oxide, peroxynitrite 등과 같은 활성질소종(reactive nitrogen species : RNS)의 과도한 생성은 지질의 과산화, 특히 low-density lipoprotein (LDL)의 산화적 변형을 유발함으로써 동맥경화와 같은 심혈관계 질환의 초기 발

병과 진행에 핵심적인 역할을 하게 된다²⁵⁾. 이와 관련한 세포 및 동물 모델을 이용한 연구 결과도 보고되어 있는데, 과산화지질 및 산화 LDL은 혈관내피세포의 손상을 야기하며, 세포부착인자의 유도와 포말세포(foam cell)의 형성 등을 촉진한다고 알려져 있다^{26,27)}. 한편 이러한 산화적 손상으로 인한 동맥경화 및 심장발작의 위험성을 최소화 하는데 있어서 항산화제가 실제로 유용한 기능을 한다고 알려져 있기 때문에 동맥경화의 치료 및 예방을 위하여 항산화제의 탐색에 많은 관심이 집중되고 있다²⁸⁾.

대표적인 redox sensitive 전사인자로서 분자 염증반응에 있어서 가장 주목받는 인자는 NF- κ B (nuclear factor- κ B)인데, 이 역시 염증 및 산화적 스트레스에 반응하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. NF- κ B와 염증 및 산화적 스트레스 간의 복잡한 관계는 ROS와 redox 상태에 따라 조절되는데, NF- κ B계는 빠른 유전자 발현 유도를 통해 방어에 관련된 여러 반응들 중에서 중추적 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 실제로 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), acute-phase proteins, immunoreceptors, 세포접착분자, 다양한 염증성 cytokine 들의 발현을 조절한다³⁰⁾. NF- κ B의 활성화와 이에 의한 유전자 발현은 노화, 암, 동맥경화증, 방사능에 의한 조직 손상, 바이러스성 복제, 급성염증상태, 조직이식 거부반응 등과 같은 여러 가지 병리적인 상태와 관련이 있는 것으로 보고되어 있으므로 NF- κ B의 활성화를 조절할 수 있는 인자들은 치료적 지표가 될 가능성이 높다³¹⁾. NF- κ B 활성화에 관여하는 인자들에는 TNF- α , lymphotoxin과 IL-1 β , mitogens, lipopolysaccharide (LPS), 단백질 합성 저해제, 산화적 스트레스, 자외선, phorbol esters와 같은 여러 가지 염증성 cytokine 등이 있다³²⁾. 흥미로운 점은 이 물질들 대부분은 ROS를 발생하는 것으로 알려져 있고, NF- κ B 활성화는 화학적으로 광범위한 항산화제에 의해 저해된다³³⁾. 염증반응과 혈관변성에 있어서의 NF- κ B가 미치는 영향을 살펴보면, 산화적 스트레스를 받은 혈관 내피세포는 NF- κ B의 활성화를 일으키는데, NF- κ B의 활성화는 먼저 IL-1 β , IL-6, IL-8과 TNF- α 를 포함하는 일부 주요 염증촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하며, 또 COX-2와 iNOS의 활성화를 조절하여 염증의 발생에 중요한 역할을 한다³⁴⁾. 동맥경화증 역시 혈관노화의 대표적인 예로써 지속적인 NF- κ B의 활성화에 의한 염증 및 혈관 평활근세포의 증식과정으로 인해 일어난다. 동맥경화 병변부위에서 평활근세포, 대식세포 및 혈관내피세포의 NF- κ B의 활성이 증가되어 있으며, 잠정적 병인인자인 oxidized LDL 또한 NF- κ B의 활성을 촉진하는 것으로 보고되어 있다³⁵⁾. 염증의 활성화나 증식 자극은 단핵구, 대식세포, 내피세포, 평활근세포, T세포에서 증명되었고 동맥경화 병소에서 중요한 역할을 한다 하고, 동맥경화 병소에서 유도되는 여러 염증성 단백질인 TNF- α , IL-1 β , MCSF, GM-CSF, MCP-1, tissue factor, VCAM-1, ICAM-1, c-myc 등은 NF- κ B에 의해 유전자 발현이 조절된다³⁶⁾.

이상의 내용을 종합해 보면, 동맥경화에 있어서 혈관내피의 산화적 스트레스와 염증반응이 핵심적인 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 따라서 동맥경화의 치료와 예방에 관한 분자생물학적인 접근을 위해서는 항산화와 항염증반응을 핵심으로 보고, 관련되는 molecule들의 변화를 살펴보는 것이 필요할 것이다.

토복령의 메탄올 추출물과 획분층들의 항산화 효과를 비교해 보기 위해 가장 먼저 DPPH radical scavenging activity를 수행하였다. 일반적으로 항산화제는 보라빛의 DPPH radical (DPPH \cdot)을 무색의(DPPH-H) 형태로 전환시키는데, 토복령의 획분층 중 EA 추출물에서 가장 우수한 IC₅₀ 값을 보였다(Fig. 2A). Superoxide radical은 산소를 이용하는 생체 내의 정상적인 대사과정에서 생성될 뿐만 아니라, organic compound들의 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 유발시킨다³⁷⁾. 본 실험에서는 xanthine oxidase를 hypoxanthine과 반응시켜서 superoxide radical을 생성시켰으며, 생성된 superoxide radical은 hypoxanthine을 uric acid로, NBT를 환원형 diformazan으로 변환시키므로³⁸⁾ 흡광도를 측정하여 약제의 superoxide radical 소거능을 측정하였다. 실험결과 토복령의 획분층 중에서 역시 EA 추출물에서 가장 강한 소거능이 관찰되었다(Fig. 2B). 생체 내 혈관내피세포에서는 superoxide radical과 nitric oxide가 생성될 수 있으며, 이들의 상호반응에 의하여 혈관세포벽 내에서 peroxynitrite가 생성되는데 이러한 일련의 반응 과정에서 LDL의 산화적 변형과 혈관내피세포의 산화적 손상이 야기될 수 있다고 알려져 있다³⁹⁾. 특히 superoxide radical과 nitric oxide의 반응으로 생성되는 peroxynitrite는 그 반응성이 superoxide와 hydrogen peroxide 보다도 강력하지만, 생체 내 방어기구는 아직까지 알려진 바가 없다. 본 실험에서 토복령 획분층의 NO에 대한 소거활성을 비교하기 위하여 SNP로 NO를 생성시키고 이를 DAF-2로 포집하여 형광강도를 측정한 결과, EA 추출물에서 가장 효과적인 NO 소거활성이 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2C).

이상의 결과를 바탕으로 토복령의 추출물 중에서 EA 추출물이 가장 뛰어난 항산화 활성이 있다고 판단하여, 사람의 혈관내피세포인 HUVEC에서 MTS assay를 실행하여 세포독성이 없는 약제의 농도를 선정하였다(Fig. 3). 그리고 H₂O₂와 TNF- α 를 산화 유발제로 사용하여 토복령 EA 추출물이 HUVEC의 세포 내 산화를 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. 이 실험의 결과 EA 추출물은 H₂O₂를 직접 처리했을 때 농도 의존적으로 세포 안에서 이를 억

제한을 알 수 있었다(Fig. 4). TNF- α 를 단독 처리했을 때도 세포 안의 산화가 유의성 있게 일어남을 알 수 있었고, 이 역시 토복령 EA 추출물에 의해서 효과적으로 억제되어서 *in vitro*상의 항산화 활성이 세포 안에서도 유효함을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 약제 자체가 세포 내 산화에 영향을 주지는 않았다. 다음으로, HUVEC 세포에 토복령 EA 추출물을 처리하고, 1시간이 지난 후에 TNF- α 를 처리하여 염증을 유발하였다. 그리고 사람의 단핵구 세포인 THP-1을 HUVEC을 반응시켜서 두 세포의 부착(adhesion)에 주는 영향을 관찰하였다. 그리고 유세포 분석기와 western blot assay를 통해서 세포 부착인자인 VCAM-1, ICAM-1의 발현과 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 IL-6와 IL-8의 생성에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 TNF- α 는 단핵구와 내피세포의 부착을 효과적으로 유도했고, 이는 토복령 EA 추출물에 의해서 농도 의존적으로 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 세포 부착인자인 VCAM-1, ICAM-1과 염증성 사이토카인인 IL-6와 IL-8 발현 역시 TNF- α 에 의해 증가되었고, 토복령 EA 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되는 것으로 나타나(Fig. 7~9), 단핵구와 내피세포 간의 부착을 억제하는 효과가 세포 부착인자의 발현 억제와 항염증 작용을 통한 기전으로 일어난 것임을 확인할 수 있었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 토복령의 획분층 중에서 EA 추출물이 뛰어난 항산화 활성을 갖고 있고, 이는 혈관내피세포에서도 역시 유효했다. 그리고 EA 추출물은 TNF- α 로 유도된 단핵구와 내피세포의 부착을 부착인자(VCAM-1, ICAM-1)와 염증인자(IL-6, IL-8)의 발현 억제를 통해서 방어하는 효과를 보였다. 따라서 토복령 EA 추출물에 대한 성분과 약리기전에 대한 더욱 심도있는 연구를 통해서 동맥경화의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다. 더 나아가서 고혈압, 류마티스 질환, 암, 당뇨 등의 만성 염증성 질환에 대한 응용도 생각해 볼 수 있을 것이다.

결 론

토복령 획분층의 항산화 활성과 사람의 혈관내피세포에서의 항산화 및 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 토복령 메탄올 추출물을 물과 혼합한 뒤, 차례로 hexane (H), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA), butanol (B)과 섞어서 획분층별 추출물을 분리했다.
2. *In vitro* 상에서 DPPH radical, ROS의 일종인 superoxide anions 그리고 RNS의 일종인 nitric oxide의 소거활성을 추출물별로 비교한 결과, 세 가지 모두에서 가장 좋은 활성을 보인 것은 EA

추출물임을 알 수 있었다.

3. 사람의 혈관내피세포인 HUVEC세포에 대한 EA 추출물의 독성을 조사하여 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(20, 50 μ g/ml)에서 실험을 진행하였다. 이는 토복령 추출물의 항산화 및 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약제들의 고유한 특성임을 말한다.
4. HUVEC세포에 4 mM의 H₂O₂와 10 ng/ml의 TNF- α 를 처리하여 세포 내 산화를 유도한 결과, 모두 효과적으로 산화가 유도됨을 확인할 수 있었고, 이는 토복령 EA 추출물에 의해서 농도 의존적으로 억제되었다. 이는 *in vitro*상의 항산화 활성이 세포에서도 적용됨을 의미한다.
5. HUVEC세포에 약제를 1시간 전 처리한 후, 10 ng/ml의 TNF- α 를 처리하여 염증을 유발하고 사람의 단핵구 세포인 THP-1과 HUVEC의 부착에 미치는 영향을 확인했다. 그 결과 토복령 EA 추출물은 TNF- α 로 유도된 단핵구와 내피세포의 부착을 방어하는 효과를 보였고, 이는 부착인자(VCAM-1, ICAM-1)와 염증인자(IL-6, IL-8)의 발현 억제의 기전을 통해서 일어남을 확인할 수 있었다.

이러한 실험 결과들로 보아, 토복령의 EA 추출물은 혈관내피에 대한 뛰어난 항산화 효과 및 항염증 효과를 가지고 있었으며, 이는 동맥경화의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있는 근거로 생각된다. 더 나아가서 고혈압, 류마티스 질환, 암, 당뇨 등의 만성 염증성 질환에 대한 응용도 생각해 볼 수 있을 것이다.

참고문헌

1. 강대영 외. 병리학. 서울 : 고문사. 2004 : 349-53.
2. 김하영, 박중열. 산화스트레스와 동맥경화증. 대한내분비학회지. 2000 ; 1(15) : 1-14.
3. Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginko biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. Free Radic Biol Med. 1996 ; 20 : 121-7.
4. Stein O, Thiery J, Stein Y. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? Atherosclerosis. 2002 ; 160 : 1-10.
5. 김창민 외 편역. 中藥大辭典. 서울 : 정담. 1997 : 4428-9.
6. Tewtrakul S, Itharat A, Rattanasuwan P. Anti-HIV-1 protease- and HIV-1 integrase activities of Thai medicinal plants known as Hua-Khao-Yen. J Ethnopharmacol. 2006 ; 105(1-2) : 312-5.
7. Yang KH. Studies on the antioxidation and antimicrobial effect of smilacis glabrae rhizoma. J Korean Oriental Med. 2004 ; 25(2) : 1-8.

8. Cai Y, Chen T, Xu Q. Astilbin suppresses collagen-induced arthritis via the dysfunction of lymphocytes. *Inflamm Res*. 2003 ; 52(8) : 334-40.
9. Jiang J, Xu Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2003 ; 85(1) : 53-9.
10. Chen T, Li J, Cao J, Xu Q, Komatsu K, Namba T. A new flavanone isolated from rhizoma *smilacis glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage. *Planta Med*. 1999 ; 65(1) : 56-9.
11. Xu Q, Yuan K, Lu J, Wang R, Wu F. A new strategy for regulating the immunological liver injury--effectiveness of DTH-inhibiting agents on DTH-induced liver injury to picryl chloride. *Pharmacol Res*. 1997 ; 36(5) : 401-9.
12. 정혜윤, 강성길, 김용석, 박영배, 고희균, 김창환. 토복령약침자극이 HgCl₂ 중독 흰쥐의 손상신에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 1998 ; 15(2) : 331-48.
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. *Biochim Biophys Acta*. 1992 ; 1115 : 201-7.
15. 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.
16. 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*. [Epub ahead of print.] 2007.
17. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999 ; 27 : 612-6.
18. Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginko biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1996 ; 20 : 121-7.
19. Han JM, Lee WS, Kim JR, Son J, Nam KH, Choi SC, Lim JS, Jeong TS. Effects of diarylheptanoids on the tumor necrosis factor- α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *J Agric Food Chem*. 2007 ; 55 : 9457-64.
20. Chen PL, Easton A. Apoptotic Phenotype Alters the Capacity of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand to Induce Human Vascular Endothelial Activation. *J Vasc Res*. 2007 ; 45(2) : 111-22.
21. Collins T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*. 1993 ; 68 : 499-508.
22. 한기훈. 이상지질혈증. 염증과 죽상동맥경화. *심장과 혈관 (Cardiovascular Update)*. 2004 ; 6(3) : 6-13.
23. Chung IM, Kim KH, Ahn JK. Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. *Kor J Med Sci*. 1998 ; 6 : 311-22.
24. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*. 1999 ; 85(8) : 753-66.
25. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 ; 25 : 29-38.
26. Tabata T, Mine S, Kawahara C, Okada Y, Tanaka Y. Monocyte chemoattractant protein 1 induces scavenger receptor expression and monocyte differentiation into foam cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 ; 305 : 380-5.
27. Asmis R, Begley JG, Jelk J, Everson WV. Lipoprotein aggregation protects human monocyte derived macrophages from OxLDL induced cytotoxicity. *J Lipid Res*. 2005 ; 46 : 1124-32.
28. Lee JH, Lee BW, Kim JH, Jeong TS, Kim MJ, Lee WS et al. LDL antioxidant pterocarpanes from roots of *Glycine max* (L.) Merr. *J Agric Food Chem*. 2006 ; 54 : 2057-63.
29. Yan ZQ, Sirsjo A, Bochaton-Piallat ML, Gabbianini G, Hansson GK. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF- κ B activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 ; 19 : 2854-62.
30. Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal*. 2006 ; 8(3-4) : 572-81.
31. Korhonen P, Helenius M, Salminen A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF- κ B in rat brain. *Neurosci Lett*. 1997 ; 225 : 61-4.
32. Grilli M, Chiu JS, Leonardo MJ. NF- κ B Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol*. 1993 ; 143 : 1-62.
33. Ivanov V, Merckenschlager M, Ceredig R. Antioxidant treatment of thymic organ cultures decreases NF- κ B and TCF1(α) transcription factor activities and inhibits alpha beta T cell development.

- J Immunol. 1993 ; 151 : 4694-704.
34. Chung HY, Kim HJ, Shin KH, Kim KW. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech Ageing Dev.* 1999 ; 111 : 97-106.
 35. Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kübler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 ; 19 : 1623-9.
 36. Pratt RE. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by angiotensin II, *Blood Press Suppl.* 1996 ; 2 : 6-9.
 37. Kujala TS, Loponen JM, Klika KD, 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.* 2000 ; 48 : 5338-42.
 38. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Thrombo Haemost.* 2004 ; 3 : 254-67.
 39. Hogg N, Darley Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J.* 1992 ; 281 : 419-24.