대한한방내과학회지 제32권 4호(2011년 12월)
Korean J. Orient. Int. Med. 2011:32(4)530-541

SH-SY5Y 세포주에서 하고초, 금은화, 황금 에탄올 추출물의 6-OHDA로 유도된 산화적 손상에 미치는 영향

민관식, 김수영, 김민우, 이기상[1]
자생한방병원 내과, [1]원광대학교 산본한방병원 심계내과학 교실

The Effect of Ethanol Extracts of *Herba Prunellae*, *Flos Lonicerae* and *Radix Scutellaria* on 6-OHDA Induced Oxidative Damage in the SH-SY5Y Cell Line

Kwan-sik Min, Su-young Kim, Min-woo Kim, Key-sang Lee[1]
Dept. of Internal Medicine, Ja-Seng Hospital Of Orient Medicine
[1]Dept. of Internal Medicine, San-Bon Hospital Of Orient Medicine, Won-Kwang University

ABSTRACT

Objectives : Categorized as '*cheongyeol*' herbs, *Herba Prunellae*, *Flos Lonicerae* and *Radix Scutellaria* have been proven to have effect on degenerative brain disease, cerebrovascular disease and brain tumor because of their anti inflammation, antioxidant, or anticancer effects. In this study, we studied activity against reactive oxygen species and anti inflammation effect of these three '*Cheongyeol*' herbs.

Methods : We measured each herb's yield of ethanol extracts, phenolic contents and activities against DPPH, hydroxyl radical and superoxide anion. Also through 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced oxidative damage in SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, we measured antioxidant effect and NO activity of the three herbs. From the three herbs, we chose *Prunella Herba*, which showed the highest antioxidant effect, and studied its cell survival rate and anti inflammation effect through COX-2 and iNOS.

Results : All three herbs showed significant results, and especially *Prunella Herba* showed significant effect on phenol contents, antioxidant effect on various active oxygen and antioxidant, and anti inflammation effect through cell line.

Conclusions : Further study of the origin concept of '*cheongyeol*' and research into specific mechanisms and role in treatment of cranial nerve disease, seems warranted.

Key words : reactive oxygen species, *Herba Prunellae*, *Flos Lonicerae*, *Radix Scutellaria*, antioxidant effect

Ⅰ. 서 론

활성산소(reactvie oxygen species, ROS)란 원자나 분자의 궤도에 반응성이 매우 강한 쌍을 이루지 않은 전자를 가진 화합물을 말하는데, 그 종류로는 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, lipid peroxy radical, singlet oxygen 등이 있다. 이들은 강한 반응성을 가지고 있어 여러 가지 산화스트레스를 유발하여, 세포내 신호전달체계에 작용하여 외부의 자극에 대한 신체의 적응 등의 생리적인 역할 뿐만 아니라, 해로운 작용으로 관절염, 뇌졸중, 악성종양, 치매 등의 직접적인 원

· 교신저자: 이기상 경기도 군포시 산본동 1126-1
원광대학교 산본한방병원 심계내과학 교실
TEL: 031-390-2670 FAX: 031-390-2319
E-mail: keysang@wonkwang.ac.kr

인이 되기도 한다[1].

이로 인해 유해산소를 억제시킬 수 있는 항산화 물질들이 개발되어 이용되고 있으나, 합성 항산화제의 간 비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암가능성 등의 부작용이 나타나 안전한 저분자 천연 항산화제 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[2].

과거 《黃帝內經》에서 또한 "正氣存內 邪不可于", "風雨寒熱 不得虛邪 不能獨傷人" 및 "邪氣所獉 其氣必虛"[3] 이라 하여 면역의 중요성에 대해 논한바 있듯이 면역증진을 통한 예방 및 건강관리에 대한 관심은 현재까지 이어지고 있다.

이에 한의학계에서는 이러한 면역증진에 도움이 될 수 있는 항산화제 개발에 寒凉의 성능으로 熱病, 瘟疫, 熱痢, 癰腫瘡瘍, 및 目赤腫痛, 咽喉腫痛 등의 각종 裏熱證에 응용하는 淸熱藥類[4]들을 연구하고 있다.

대표적인 淸熱藥 중 하나인 하고초(*Herba Prunellae*)는 淸熱散結, 淸熱解毒, 淸肝明目, 降血壓 등의 작용을 가지며, 면역조절작용, 암전이 억제 및 항균작용 등이 있다[4-7].

황금(*Radix Scutellaria*)은 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血, 安胎 작용을 가지며 진통 및 항염, 진경작용과 혈압강하작용, 항산화작용, Ca++ overload 억제작용 및 지방축적 억제효과 등이 있다[4,8-11].

금은화(*Flos Lonicerae*)는 淸熱解毒, 凉血止血, 散風熱 작용을 가지며 항암 및 알레르기 억제효과, 알도즈 환원 효소 억제 효과, 항염증 및 항균 작용이 있다[4,12-15].

이에 본 연구에서는 항산화 효과가 있다 사료되는 하고초, 황금 및 금은화의 청열 작용을 통한 항산화 작용을 확인하고자 각 약물의 에탄올 추출물에 대한 연구로 총 페놀 함량과 활성산소 소거능을 측정하였고 또 대표적인 신경독성을 가진 화합물인 6-hydroxydopamine(6-OHDA)로 SH-SY5Y 신경아세포종 세포주로부터 산화적 스트레스를 유발하여 활성산소를 유도한 후 각각 청열약의 항산화작용을 측정하였다. 또한 신경세포에 대한 독성을 알아보기 위하여 청열약중 가장 항산화작용이 좋은 것으로 보이는 약물인 하고초에 대한 세포활성도를 보았고, 세포염증발현의 가장 대표적인 지표단백질이라고 볼 수 있는 iNOS와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현억제 정도를 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에서 사용한 약재인 하고초(*Herba Prunellae*), 황금(*Radix Scutellaria*), 금은화(*Flos Lonicerae*)를 옴니허브(Youngcheon, Korea)에서 구입하였다.

2) 세포주

인간신경아세포종인 SH-SY5Y 세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, 이하 KCLB)을 통해 구입하였으며, DMEM 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum(Gibco, NY, USA)와 1% penicillin-streptomycin(Gibco, NY, USA) 항생제를 넣어 5% CO_2가 든 37ºC humidified incubator(CO_2 incubator, MCO-17AIC, Sanyo, Japan)에서 배양한다. 각 실험에 사용된 세포는 70% 정도의 밀도로 준비하였다.

3) 시약 및 항체

세포 배양에 사용한 DMEM(Dulbecco' modified Eagle' medium) media, FBS(fetal bovine serum) 및 antibiotic-antimycotic은 Gibco BRL(Grand Island, NY)에서 구입하였다. WST-1 assay kit는 Roche에서 구입하였으며, Propidium Iodide 염색 시약은 Sigma-Aldrich(Michigan, USA)에서 구입하였고, 실험에 사용한 antibody인 iNOS 및 COX-2는 santa cruz biotechnology(CA, USA)에서 구입하였다.

2. 방 법

1) 약재 추출

정량된 약재 100 g을 상온에서 1 L의 80% 에탄올에 ultra-sonicator(Branson, U.S.A)에서 15분간 sonication을 시킨 다음 약간의 break time(10분)을 가진(발열반응이 일어남) 후 재차 한 번 더 반복하였다. 추출된 액은 3 mm 여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과하였다. 여과하고 남은 잔사물은 다시 80% ethanol을 넣고 위의 과정을 반복한 후 1차와 2차 추출액을 혼합하여 45 ℃ 이하에서 감압농축기(rotary vacuum evaporator, N-1000, Eyela, Japan)를 이용하여 감압농축하였다. 농축 후 예비 동결 기계를 이용하여 20-30 min 정도 동결 시킨 후 -70 ℃ 동결건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)를 이용하여 1시간 동안 건조하였다. 이렇게 얻은 하고초, 황금 및 금은화의 분말 15.1 g, 27.56 g, 35.0 g(추출수율 각 15.1%, 27.56%, 35.0%)를 3차 증류수에 200 mg/ml로 녹인 후 -20 ℃ 냉동고에 보관해두고 실험시에 희석하여 사용하였다.

2) 총 페놀성 물질의 함량 측정

총 페놀성 물질은 Folin & Ciocalteu's 시약을 사용하여 Singleton과 Lamuela-Raventon의 방법을 이용하여 측정하였다[16]. 하고초, 황금 및 금은화 시료 1 mL에 2배 희석된 Folin & Ciocalteu 1 mL을 가하여 잘 혼합한 다음 3분간 반응시키고 나서 10% sodium carbonate 1 mL을 첨가하여 1시간 방치한다. 반응 후 760 nm의 흡광도에서 측정한 다음 표준품인 gallic acid 의 표준곡선과 대비하여 농도를 구하였다.

3) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거 활성 측정

추출물의 전자공여능(EDA; eletron donating abilities) 측정은 Blois의 방법을 따라 측정 하였다[17]. 각 시료는 일정한 농도로 에탄올에 녹여 1, 5, 20, 50, 100, 200 및 500 ㎍/ml의 농도로 희석한 하고초, 황금 및 금은화의 시료 0.1 mL에 에탄올로 희석한 0.1 mM DPPH 0.1 mL를 가한 후 실온에서 20분간 반응시킨 다음 ELISA microplate reader (Bio Rad Laboratories Inc., California, USA, Model 550) 545 nm에서 흡광도를 측정하며, 시료 대신 에탄올을 가한 대조군에 대해 시료를 넣었을 때의 흡광도 감소정도를 조사하였다.

DPPH radical 소거활성(%) = $[(A_0-A_1)/A_0]\times100$

A_0 : 대조군의 흡광도

A_1 : 시료를 첨가한 시험군의 흡광도

4) Hydroxyl radical 소거능력 측정

Hydroxyl radical 소거활성은 Fenton reaction에 의해 생성되는 OH · radical을 발생시켜 이에 대한 소거활성을 측정하였다. Gutteridge의 방법[18] 에 따라 0.02 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.30 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.15 mL, 10 mM FeSO4 0.15 mL, 10 mM EDTA 0.15 mL, 10 mM H_2O_2 0.15 mL, H_2O 0.525 mL 및 1, 5, 20, 50, 100, 200 및 500 ug/ml의 농도로 희석 제조된 하고초, 황금 및 금은화의 시료 0.075 mL를 가하고 잘 혼합하여 37 ℃에서 2시간 동안 반응시킨 다음 2.8% TCA(trichloroacetic acid) 0.75 mL과 1.0% TBA (Tiobarbituric acid) 0.75 mL을 가한 다음 20분간 끓는 물에서 반응을 시킨다. 반응 후 냉각한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hydroxyl radical 소거활성(%) = $[(A_0-A_1)/A_0]\times100$

A_0 : 대조군의 흡광도

A_1 : 시료를 첨가한 시험군의 흡광도

5) Superoxide anion radical 소거능력 측정

Xanthine/xanthine oxidase계에서 발생하는 superoxide anion radical이 nitroblue tetrazolium (NBT)의 반응에 의해 발색되어지는데 이때 시료에 의해 superoxide anion radical이 감소하여 반응액의 흡광도가 감소되는 비율을 측정한다[19]. 반응은 0.05 M phosphate buffer 1.0 mL, 3 mM xanthine 0.04 mL, 3 mM EDTA 0.04 mL, 0.15% bovine serum albumin 0.04 mL, 15.0 mM NBT 0.04 mL 및 1, 5, 20, 50, 100, 200 및 500 ㎍/ml의 농도별 하고초, 황금 및 금은화의 시료 0.04 mL을 혼합한 후 25 ℃에서 10분간 반응한 다음 1.5 U/mL xanthine

oxidase 0.04 mL을 가하여 25 ℃에서 20분간 반응시킨다. 20분 후 반응액을 560 nm에서 흡광도를 측정한다.

Superoxide anion radical 소거활성(%) = $[(A_0-A_1)/A_0]\times100$

A_0 : 대조군의 흡광도

A_1 : 시료를 첨가한 시험군의 흡광도

6) WST-1 assay를 이용한 세포 생존률 측정

SH-SY5Y 세포를 하루 전날 96 well plate에 $1x10^4$/well로 분주한 후 세포가 하루 동안 plate 바닥에 붙도록 배양한다. 다음날 100 ㎕의 하고초 추출물을 각각의 농도(0, 50, 100, 200, 500, 1,000 ㎍/ml)에 맞게 넣어 준 후 배양기에서 48시간 동안 배양한다. 48시간 후 WST-1 solution을 10 ㎕씩 각각의 well에 넣고 2시간 배양한 후 물에 녹아져 나온 formazan(water-soluble formazan)을 ELISA reader 기기(Molecular devices, VersaMax microplate reader, USA)로 440 nm 필터에서 값을 측정하였다[20].

7) Nitrite assay

배양된 세포를 5×10^4cells/well수준으로 96 well plate에 100 µl씩 접종한 다음 24시간 동안 예비 배양 하였다. 24시간 후 medium을 제거한 후 DMEM으로 희석된 각 농도별 시료 100 ㎕를 가하여 1시간 미리 배양한 다음 6-OHDA 를 처리하여 18시간 후 세포에서 media으로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정하였다. 즉, medium 150 ul와 griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) 20 ㎕ 그리고 증류수 130 ㎕를 가하여 실온에서 30분간 반응 후 ELISA micro plate reader(Bio Rad Laboratories Inc., California, USA, Model 550)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

8) ROS 생성량 측정

DCHF-DA molecule는 세포막을 투과한 후 활성산소종과 산화적 반응에 의하여 fluorescent 2,7-dichlorofluorescein(DCF)로 전환된 후 형광을 띄게 된다. 따라서 이 DCHF-DA를 사용한 활성산소종의 측정은 산화적 스트레스에 의한 세포 손상에 대한 정도 측정을 위해 널리 사용되고 있다. SH-SY5Y세포를 well 당 5×10^4 cells로 100 ㎕씩 접종한 다음 24시간 동안 예비 배양 하였다. 24시간 후 medium을 제거한 후 DMEM으로 희석된 각 농도별 시료 100 ㎕를 가하여 1시간 미리 배양한 다음 LPS(1 ㎍/mL) 10 ㎕를 처리하여 18시간 배양하였다. 세포내의 ROS의 양은 형광 probe인 DCFDA (2′7′-dichlorofluorescin diacetate)를 사용하여 측정하였다. 즉, DCHF-DA를 well 당 50 uM로 처리하여 37℃에서 30분간 반응 후 형성된 세포내 과산화물을 excitation 파장 485 nm, emission 파장 530 nm에서 fluorescence(Type 374, Labsytems, Finland)를 측정하였다.

9) Western blot analysis

SH-SY5Y 세포를 100 mm culture plate에 7×10^5/plate로 10% FBS DMEM에 12시간 동안 안정화 시켰다. 안정화 후 세포는 각 조건에 맞게 하고초를 처리한 후 시간에 맞게 샘플을 모았다. 샘플을 모을 때는 plate에 붙어있는 세포뿐만 아니라 붙어있지 않은 세포까지 튜브에 다 모은 후 원심분리(2,000 RPM, 5 min)로 cell down 한 후 그 상층액을 버리고, 차가운 PBS로 2번 washing하여 cell pellet만 남겼다. 각 시간별로 모아진 세포는 protein lysis buffer를 이용하여 단백질만 분리하고, 단백질의 정량은 bradford(bio-rad protein assay kit) 시약으로 하였으며, SDS-PAGE gel에 동량의 단백질을 loading하여 분리한 후, nitrocellulose membrane에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane은 1% BSA +1% skim milk가 섞인 PBST(1×PBS in 0.1% Tween-20)로 상온에서 1시간 동안 blocking한 후, 여러 가지 1차 항체를 4 ℃에서 over night(O/N)으로 반응시킨 후, PBST로 washing하여 HRP-conjugated 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 역시 PBST를 사용하여 washing 과정을 거친 다음에 Electrochemiluminescence detection system

(Amersham- Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 이용하여 X-ray film으로 결과를 확인하였다.

3. 통계처리

실험결과의 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 mean ± standard deviation으로 요약하였으며, Student t-test 혹은 ANOVA로 분석하였다. 각 군간의 차이는 Duncan's multiple-range test를 통해 사후검정을 시행하였으며, 각 실험은 3회씩 반복처리 되었다. P-value가 0.05이하일 경우 유의성을 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 추출수율 및 총 페놀 함량

하고초, 황금, 금은화 추출물의 총 페놀성 물질의 함량을 Folin & Ciocalteu's 시약을 사용하여 측정하였다.

각각의 수율은 15.10, 27.56 및 35.00%였으며, 총 페놀의 함량은 하고초가 100 g의 추출물에서 총 10.49±0.70 g/100 g으로 가장 많은 페놀함량을 가지고 있었다(Table 1).

Table 1. Yields and Phenolic Contents of Traditional Medicinal Plant Extracts.

Family and scientific name (Medicinally used parts)	Yields (g/100 g of powder, dry weight)	Total phenolics (g/100 g of extract, dry weight)
Herba Prunellae (aerial parts)	15.10	10.49±0.70
Radix Scutellaria (roots)	27.56	7.91±0.57
Flos Lonicerae (floral bud)	35.00	7.13±1.53

2. 각 에탄올 추출물의 항산화 활성

80% 에탄올로 추출한 하고초, 황금 및 금은화 추출물의 각 분획물에 대한 DPPH radical 소거능은 하고초(IC_{50}=53.63 ㎍/mL), 황금 85.87 및 금은화 88.44의 순으로 하고초의 소거능이 가장 좋았다. 이러한 결과는 앞의 총 페놀성 물질의 함량과 관련성이 있음을 보여주고 있다. 또한 superoxide anion 역시 하고초가 가장 높은 활성을 보였으나 hydroxyl radical에 대한 소거활성은 하고초보다 황금이 우세하였다. 양성 대조약물로 녹차의 활성물질인 Catechin 과 Quercetin 을 사용하여 비교하였다(Table 2).

Table 2. DPPH, Superoxide and Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Medicinal Plant Extracts.

Family and scientific name (Medicinally used parts)	DPPH (μg/mL, IC50)	O_2•- (μg/mL, IC50)	OH• (μg/mL, IC50)
Herba Prunellae (aerial parts)	53.63±4.01	62.35±3.52	42.21±3.89
Radix Scutellaria (roots)	85.87±7.76	98.24±1.25	38.35±2.65
Flos Lonicerae (floral bud)	88.44±6.59	>100	68.78±1.24
Catechin	33.99±1.07	49.21±4.25	24.84±1.25
Quercetin	42.17±1.23	31.01±2.20	45.25±0.85

All values are means duplicate determinations. IC50 values were defined as the extract concentrations required to scavenge 50% of radicals.

3. in vitro 에서의 청열약 항산화 활성

6-OHDA 유도 SH-SY5Y 세포주의 활성산소에 대한 항산화효과를 보았다. TBARS의 경우 6-OHDA 처리 후 현저히 상승되었으며, 하고초 및 청열약의 투여로 인해 세 약물 모두 유의하게 TBARS가 저하되었다. Catalase의 경우 6-OHDA에 의해 저하된 catalase를 하고초의 경우 비유도군 수준까지 회복시켰다. 그러나 SOD의 경우 특이할 만한 변화를 보여주지 않았다(Table 3).

Table 3. Effects of Medicinal Plants Extracts on TBARS and Antioxidant Enzyme in 6-OHDA-induced SH-SY5Y Cells.

	TBARS (nmol/mg protein)	CAT (k/mg protein)	SOD (U/mg protein)
SH-SY5Y	9.02±0.50[a]	1.75±0.10[a]	2.16±0.13[a]
SH-SY5Y + 6 OHDA	17.91±0.39[b]	0.97±0.09[b]	2.21±0.27[b]
SH-SY5Y + 6 OHDA + *Herba Prunellae*	13.41±0.27[c]	1.68±0.11[a]	2.32±0.14[c]
SH-SY5Y + 6 OHDA + *Radix Scutellaria*	14.25±0.41[c]	1.42±0.07[c]	2.24±0.19[b]
SH-SY5Y + 6 OHDA + *Flos Lonicerae*	15.28±0.47[c]	1.29±0.07[c]	2.27±0.11[c]

Samples concentrations were all at 100 μg/mL. SH-SY5Y cells were preincubated for 24 h with each plant extracts and then treated with 50 μM 6-OHDA for 2 h. Values represent the means ± standard deviations of three independent experiments. Values with different superscripts were significantly different at the $p<0.05$ level by Duncan's multiple-range test.

4. 하고초, 금은화, 황금의 NO 활성 억제기능

6-OHDA 유도 SH-SY5Y 세포주의 염증반응 지표라고 할 수 있는 Nitic oxide의 생성억제효과는 하고초와 황금만이 세포독성을 가지지 않는 100 ㎍/mL의 농도에서 약 55%와 42%의 생성억제 효능을 보여주어 50%이상의 억제효능은 하고초만이 보여주었고, 금은화의 경우 그 억제효과를 보여주지 않았다(Table 4).

Table 4. Inhibitory Effect of Medicinal Plant Extracts on 6-OHDA-induced NO Production in SH- SY5Y Cells.

Family and scientific name (Medicinally used parts)	Nitrite inhibition percentage
SH-SY5Y + 6 OHDA (induced control)	100[a]
SH-SY5Y + 6 OHDA + *Herba Prunellae*	44.32±6.62[b]
SH-SY5Y + 6 OHDA + *Radix Scutellaria*	57.98±12.74[b]
SH-SY5Y + 6 OHDA + *Flos Lonicerae*	87.45±8.80[a]

5. 하고초의 세포 생존률 측정

신경세포에 대한 독성을 알아보기 위하여 연구한 세 약물 중 가장 항산화작용이 좋은 것으로 나타난 하고초를 선별하여 농도별 투여가 인간신경아세포종의 세포증식에 영향을 미치는지를 조사하였다. 세포주의 생존율은 100 ㎍/mL에서부터 유의한 세포 생존 억제효과를 보였고, 100 ㎍/mL 농도까지는 $p<0.01$의 유의수준에서 세포의 생존에 영향을 미치는 않았다(Fig. 1).

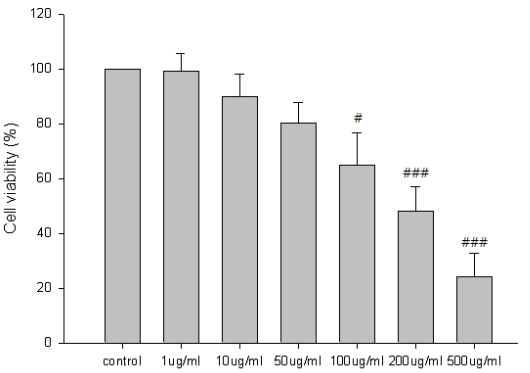

Fig. 1. Effects of *Herba Prunellae* on the cell viability dose manner.

#:p<0.05, ###:p<0.001

6. 청열약의 항산화 관련 단백질 발현

3가지 청열약중 가장 뛰어난 항산화 작용을 보인 하고초의 경우 6-OHDA로 발현된 iNOS와 COX-2를 100 ㎍/mL의 농도에서부터 현저하게 유의한 수준까지 떨어뜨려, 항염증효능을 보였다(Fig. 2).

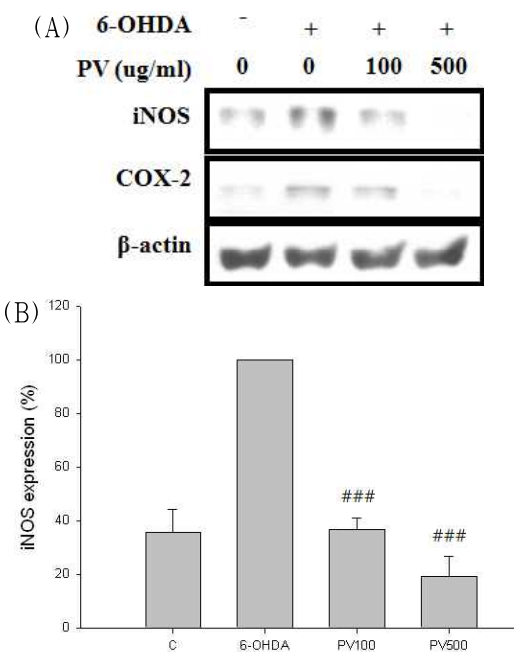

Fig. 2. Effects of *Herba Prunellae* on iNOS and COX-2 protein expression (A) and the inhibitory percentage of iNOS and COX-2 expression (B).

###:p<0.001.

Ⅳ. 고 찰

인간을 포함한 호기성 호흡을 하는 생명체는 생명유지에 필요한 에너지를 만들기 위해 산소를 세포 내로 받아들이며 일반적인 경우 대부분의 산소는 산화적 인산화 과정을 통해 정상적으로 환원된다. 하지만 일부의 산소는 부분 환원되어 활성산소를 생성하게 된다[21].

이렇게 생성된 활성산소(ROS)는 인체에 긍정적인 역할과 부정적인 역할을 수행한다. 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아의 손상은 세포의 돌연변이나 노화를 유발하거나, 점진적인 세포내의 자유라디칼의 축적에 의해 세포사멸과 류마티스관절염 등의 각종 염증성질환, 신경계의 손상 등의 각종 질환의 발병을 가속화 시킨다[22]. 미토콘드리아에서의 산화적 인산화반응은 고에너지의 전자이탈로 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, lipid peroxy radical, singlet oxygen 등의 자유라디칼(free radical)이 생성되어 미토콘드리아 내의 지질과산화나 DNA, RNA와 같은 핵산물질의 산화적 손상을 일으킨다[23].

일반적인 활성산소의 생성기전으로, 인체 내에서 자연스럽게 생성되는 ROS는 peroxisome의 긴사슬 지방산(long chain fatty acids)이 산화되면서 H_2O_2가 부산물로 생성되거나, lipoxygenase가 arachidonic acid를 전환하는 중에도 생성된다. 또 미토콘드리아의 electron transport chain을 지나는 전자에서 일부가 흘러나와 O_2와 결합하여 superoxide radical이 생성되기도 하여 각종 질병의 발생원인인 산화스트레스로 작용하기도 한다. 외인성으로는 자동차 등에서 생성되는 배기가스 등의 환경오염물질, 담배연기, 복사에너지, 자외선, 페놀성 화합물 등에서 ROS가 생성되기도 한다[1]. 일반적으로 이러한 환경

스트레스 하에서의 항산화효소 등이 활성화되는데 이는 항산화 방어기전의 유도에 의해 스트레스에 의해 증가된 산화적 스트레스의 극복을 위한 생체 내의 방어기전으로 해석된다.

인체 내에서는 산화적 스트레스에 대한 자체적인 방어기전을 가지고 있는데 이는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase 등의 항산화효소들이다. 이들은 자유라디칼을 인체에 무해한 수분으로 변화시킴으로써 세포에는 어떤 산화적 손상이 가지 않도록 방어하는 기능을 가지고 있다[24]. 이에 최근 노화 및 암, 염증, 동맥경화, 심장병, 치매 등 각종 질병과 자유라디칼과의 관련성이 대두되며 항산화제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[25]. 하지만 합성 항산화제의 간 비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암 가능성[2] 등의 부작용이 나타나 안전한 저분자 천연 항산화제 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 특히 천연식물의 추출물은 약리적 효능과 더불어 항산화 작용을 할 수 있는 생리 활성 물질이 있어 유용한 연구재료가 되고 있다[26]. 이런 추세를 반영하여 한약의 항산화 효과에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며 寒凉의 성능을 지닌 淸熱藥類 또한 그 중 하나이다.

淸熱藥은 寒凉의 성능을 구비하며 解熱, 消炎, 抗菌, 抗感染作用이 있어서 주로 熱病, 溫疫, 痢疾 및 癰腫瘡毒 등의 각종 熱病을 치료하며 각 약물의 작용부위와 효과에 따라 淸熱瀉火藥, 淸熱燥濕藥, 淸熱凉血藥, 淸熱解毒藥 및 淸虛熱藥으로 구분이 된다[4].

하고초(*Herba Prunellae*)는 단향과에 속하는 댑싸리하고초의 전초와 꿀풀과에 속하는 꿀풀하고초의 전초를 뜻하며 苦, 辛, 寒, 無毒한 성질을 지닌다. 주요 작용으로는 淸熱散結, 淸熱解毒, 淸肝明目, 降血壓 등의 효능이 있어 瘰癧, 瘿瘤 , 肝火上炎, 目赤, 頭痛, 高血壓 등의 병증을 치료한다[4]. 또한 면역조절작용, 암전이 억제 및 항균 작용 등에 대한 연구가 보고된 바 있다[4-7].

황금(*Radix Scutellaria*)은 꿀풀과에 속한 속썩은풀의 뿌리를 말하며 苦, 寒, 無毒한 성질을 지닌다. 주요 작용으로는 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 止血, 安胎등의 효능이 있어 濕熱黃疸, 瀉痢, 熱痳, 氣分實熱, 肺熱咳嗽, 癰腫瘡毒, 血熱의 出血 및 胎熱不安 등의 병증을 치료한다[4]. 또한 진통 및 항염, 진경작용과 혈압강하작용, 항산화작용, Ca++ overload 억제작용 및 지방축적 억제효과 등에 대한 연구가 보고된 바 있다[4,8-11].

금은화(*Flos Lonicera*e)는 인동과에 속한 인동덩굴의 꽃봉우리를 말하며 甘, 寒, 無毒한 성질을 지닌다. 주요 작용으로는 淸熱解毒, 凉血止血, 散風熱 효능이 있어 外癰內癰, 熱毒瀉痢, 外感風熱, 溫病初起 등의 병증을 치료한다[4]. 또한 항암 및 알레르기 억제효과, 알도즈 환원 효소 억제 효과, 항염증 및 항균 작용 등에 대한 연구가 보고된 바 있다[4,12-15].

이에 본 연구에서는 우선 청열의 작용을 가지며 기존의 연구에서 항염증 및 항산화 효과를 가진 것으로 보고되어진 청열약물 중 하고초, 황금, 금은화를 선정하여 각 에탄올 추출물의 수율, 총 페놀의 함량을 측정하였으며 각 추출물 자체의 DPPH, hydroxyl radical 및 superoxide anion에 대한 활성도를 측정하였다.

본 연구 결과 각각의 수율은 하고초, 황금, 금은화 순으로 15.00, 27.56 및 35.00%였으며, 총 페놀의 함량은 하고초가 100 g의 추출물에서 총 10.49±0.70 g/100 g으로 가장 많은 페놀함량을 가지고 있었다. 80% 에탄올로 추출한 하고초, 황금 및 금은화 추출물의 각 분획물에 대한 DPPH radical 소거능은 하고초(IC50=53.63 ug/mL), 황금 85.87 및 금은화 87.44의 순으로 하고초의 소거능이 가장 좋았으며 이는 앞의 총 페놀성 물질의 함량과 연관성을 보여주었다. 또한 superoxide anion 역시 하고초가 62.35로 가장 높은 활성을 보여주었으며 반면 hydroxyl radical에 대한 소거활성은 황금이 38.35로 42.21인 하고초보다 우세하였다.

6-Hydroxydopamine (6-OHDA)은 MPTP와 더

불어 신경계통의 독성유발에 많이 사용되는데, 신경독성에 대한 생화학적 기작은 아직 밝혀진 것은 없다. 단지 6-OHDA 자체 독성의 의해 미토콘드리아의 NADH dehydrogenase와 cytochrome c oxidase를 직접 방해한다고 알려져 있다[27].

약물처리에 의해 6-OHDA에 의해 생성이 촉진된 O_2•-는 그 전환효소인 superoxide dismutase (SOD)에 의해 H_2O_2로 전환된다. 또 전환된 H_2O_2는 catalase와 glutathion peroxidase(GPx)에 의해 소거된다. 특히 H_2O_2는 강한 독성을 가진 활성산소종으로 생성 즉시 catalase(CAT)를 비롯한 다양한 peroxidase(POD) 또는 ascorbate-glutathione cycle의 효소들에 의해 신속하게 제거되어야 한다. superoxide anion의 소거과정이 superoxide dismutase에 의한 효소적 과정이든 비효소적 과정이든 간에 항상 대사산물로 H_2O_2를 생성하게 되는데 이것은 calvin cycle의 강력한 억제자일뿐만 아니라 superoxide anion과의 상호작용의 결과로 높은 반응성을 지닌 hydorxyl radical을 생성하기 때문에 superoxide anion의 hydrogen peroxide로의 전환은 문제점을 항상 지니게 된다[28,29].

NO는 높은 반응성을 가진 free radical로서 체내의 신호전달, 혈관확장 등 다양한 생리적 기능을 가지고 있다[30]. NO는 염증질환에 있어서 중요한 매개물질로서 과도하게 생성된 NO는 패혈증, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 전신 홍반성 낭창과 같은 광범위한 염증성질환을 유도한다[31].

NO는 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 합성되며, NOS는 3종류의 동종효소로 나눠진다. TypeⅠ은 neuronal NOS(nNOS), TypeⅢ는 endothelial NOS(eNOS)로 둘 다 세포내에 항상 일정한 수준으로 존재하므로 constitutive NOS(cNOS)로 불리며, 생리기능유지에 필요한 낮은 농도의 NO를 생성한다. 반면 typeⅡ는 interferon-γ(IFN-γ)를 포함하는 다양한 염증성 cytokine이나, 내독소인 lipopolysaccharide(LPS) 등에 노출되어야만 발현되는 inducible NOS(iNOS)로 이는 대량의 NO를 생성하여 지속적인 염증반응을 유발시켜 여러 가지 병리적 염증질환을 일으킨다[32-34].

Cyclooxygenase(COX)는 cyclooxygenase-1(COX-1)과 cyclooxygenase-2(COX-2)로 분류 되는데, 이들은 모두 arachidonic acid(AA)를 PGs로 전환시키는 효소들이다. 그러나 COX-1은 체내에서 혈소판의 생성, 위벽보호, 신장 기능의 유지 등 정상적인 생리기능에 작용하는 반면, COX-2는 주요 염증매개물질인 PGE2를 생성시켜 병리적인 염증반응에 관여한다고 알려져 있다[35,36].

본 연구에서는 기존의 연구와는 차별되게 인간신경아세포종 세포주인 SH-SY5Y에 6-OHDA로 ROS를 유도시킨 후 이들 세포주에서 세가지 청열약물들의 항산화 작용 및 NO 활성 억제기능을 확인하였다. 또한 淸熱藥類의 항염증 효과를 한층 더 확인하기 위해 세 가지 약물 중 가장 항산화작용이 좋은 것으로 보여진 하고초에 대한 세포활성도와 COX-2 및 iNOS의 단백질 발현 억제 효과를 확인하였다.

본 연구에서 6-OHDA 유도 SH-SY5Y 세포주의 활성산소에 대한 항산화효과를 본 결과 6-OHDA 처리 후 17.91까지 상승된 TBARS가 하고초는 13.41, 황금은 14.25, 금은화는 15.28로 세 약물 모두 유의하게 TBARS가 저하되었다. Catalase의 경우 세 약물 모두 6-OHDA에 의해 저하된 catalase에 대해 유의한 결과를 보였으며 그 중 하고초의 경우 비유도군 수준인 1.75과 근접한 1.68까지 회복시켰다. 그러나 SOD의 경우 세 약물 모두 특이할 만한 변화를 보여주지 않았다.

또한 6-OHDA 유도 SH-SY5Y 세포주의 염증반응 지표라고 할수 있는 nitic oxide의 생성억제효과는 하고초와 황금만이 세포독성을 가지지 않는 100 ug/mL의 농도에서 약 65%와 42%의 생성억제 효능을 보여주어 50%이상의 억제효능은 하고초만이 보여주었으며, 금은화의 경우 87.45%로 그 억제효과를 보여주지 않았다. 이는 6-OHDA에 유도된 인간신경아세포종세포의 ROS의 감소 경향과 유의한

결과를 보여주고 있다.

하고초의 농도별 투여에 따른 세포주의 생존율의 경우 100 ㎍/mL에서부터 유의한 세포 생존 억제효과를 보였고, 100 ㎍/mL 농도까지는 p<0.01의 유의수준에서 세포의 생존에 영향을 미치는 않았다. 또한 하고초의 iNOS와 COX-2의 발현의 경우 6-OHDA로 발현된 iNOS와 COX-2를 100 ㎍/mL의 농도에서부터 현저하게 유의한 수준까지 떨어뜨리는 모습을 보였다.

이상의 연구결과를 종합해보면 이들 淸熱藥物들의 에탄올 추출물은 항산화, 항염증 효과에 대하여 유의한 결과를 보였으며 특히 하고초의 경우 황금 및 금은화보다 자체의 페놀함량, 각종 활성산소에 대한 활성도 억제 효과 및 세포주를 통한 항산화 및 항염증 작용에 특히 더 유효한 효과를 가진 것으로 연구되었다. 이를 통해 현재까지 보고된 하고초의 면역조절작용, 암전이 억제 및 항균 작용과 더불어 본 연구에서 보고한 항염 및 항산화 작용을 활용한 임상에서의 응용 및 신약제제의 개발에 유의성이 있다 사료된다.

이 연구는 淸熱藥의 활성산소 소거능, 신경세포에 대한 항산화작용 및 대표적인 염증성 기전의 연구로 한의학의 淸熱작용이 지닌 解熱, 消炎, 抗菌, 抗感染作用을 통한 인체의 면역력 상승이 淸熱藥類의 항염증 및 항산화제로서의 역할과의 연계성에 대한 연구로서 중요한 의미가 있다고 사료되며 이 연구결과를 바탕으로 기존 한의학적인 淸熱의 개념과 뇌신경계통의 질환 치료제로서의 역할 및 구체적인 기전에 대해 추후 연구가 필요하다 하겠다.

Ⅳ. 결 론

1. 80%에탄올 추출 청열약 3종의 추출수율은 하고초, 황금 및 금은화 각각 15.10%, 27.56%, 35.00%였고, 페놀의 함량이 하고초가 10.49±0.70 g/100 g으로 가장 많은 페놀함량을 가지고 있었다.
2. 80% 에탄올로 추출한 하고초, 황금 및 금은화 추출물의 각 분획물에 대한 DPPH radical 소거능은 하고초 (IC50=53.63 ug/mL), 황금 85.87 및 금은화 88.44의 순으로 하고초의 소거능이 가장 좋았다.
3. 6-OHDA 처리에 의해 현저히 상승된 TBARS와 현저히 저하된 catalase의 경우 3종의 청열약 모두 유의한 항산화 효과를 보여주었으며, 특히 하고초의 경우 catalase를 6-OHDA 처리전의 상태까지 회복시켰다
4. Nitic oxide의 생성억제효과는 하고초가 세포독성을 가지지 않는 100 ug/mL의 농도에서 50% 이상의 억제효과를 나타내었다.
5. 하고초는 100 ug/mL 농도까지는 p<0.01의 유의수준에서 세포의 생존에 영향을 미치는 않아 세포독성을 보이지 않았다.
6. 하고초는 6-OHDA로 발현된 iNOS와 COX-2를 100 ug/mL의 농도에서부터 현저하게 유의한 수준까지 떨어뜨려, 항염증효능을 보였다.

감사의 글

이 논문은 2010학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. 임소윤, 박시원. Farensol의 HL-60 세포에 대한 세포독성과 활성산소 및 항산화효소 활성변화. 약학회지 2006;50(6):372-80.
2. Branen AL. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytolune. *JAOCS* 1975;52:59-65.
3. 전국 한의과대학 피부외과학 교재편찬위원회. 韓醫皮膚外科學. 서울: 도서출판 선우; 2007, p. 81-2.

4. 신민교. 임상본초학. 서울: 영림사; 2002. p. 361-411.
5. 서부일, 김선희, 금선희. 하고초의(夏枯草) 면역조절작용 및 알레르기 저감화에 관한 연구. 대한본초학회지 1997;12(1):7-19.
6. 허자경. 면역활성에 의한 하고초의 암전이 억제효과. 대한한방부인과학회지 2009;22(1):41-52.
7. Wang ZJ, Zhao YY, Tu GZ, Hong SL, Chen YY. Studies on the chemical constituents from Prunella vulgaris. *Acta Pharm Sin* 1999;34(9):679-81.
8. Krieglstein J. Pharmacology and drug therapy of cerebral ischemia. In: Schurr A, Rigor BM, eds. Cerebral ischemia and resuscitation. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 347-71.
9. Kyo R, Nakahta N, Sakakibara I, Kubo M, Ohizumi Y. Baicalin and baicalein, constituents of an important medical plant, inhibit intracellular Ca2+ elevation by reducing phospholipase C activity in C6 rat glioma cells. *J Pharm Pharmacol* 1988;50(10):1179-82.
10. Lee JK, Song YK, Lim HH. 황금(黃芩)의 진통효과와 항염효과. 대한한의학회지 2007;28(4):124-35.
11. 김경선, 차민호, 이수원, 윤유식. 황금(黃芩, Scutellariae Radix)의 지방축적억제 효능연구. 진주산업대학교논문집 2003;9(2):45-54.
12. 배만종, 예은주. 금은화로 배양한 표고버섯 균사체 추출물의 항암 및 알레르기 억제효과 검증. 한국영양학회지 2007;36(4):424-30.
13. 이윤미, 김란희, 김종민, 김영숙, 장대식, 김주환, 등. 한국산 한약재(생약) 추출물의 알도즈 환원 효소 억제효능 검색과 꽃개오동의 수정체 혼탁 억제. 생약학회지 2008;39(3):165-73.
14. 차재영, 하세은, 심선미, 박종군, 정연옥, 김현중, 등 국내 자생 향장식물 에탄올 추출물의 항균 효과. 생명과학회지 2008;18(2):228-33.
15. 윤용갑, 김규민, 이성준, 유승훈, 장선일, 김민규. 금은화 수용성 추출물의 LPS 유도 염증매개물 억제 효과. 대한본초학회지 2007;22(3):117-25.
16. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999;299:152-78.
17. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;26:1199-200.
18. Gutteridge JM. Reactivity of hydroxyl and hydroxyllike radicals discriminated by release of thiobarbituric acid reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem J* 1984;224:761-7.
19. Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, et al. Rats Expressing Human Cytosolic Copper-Zinc Superoxide Dismutase Transgenes with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Associated Mutations Develop Motor Neuron Disease. *J Neuroscience* 2001;21(23):9246-54.
20. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth* 1986;89:271-7.
21. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
22. Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 1994;69:328-35.
23. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases. *Science* 1992;256:628-32.

24. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 1995;9:526-33.
25. Amen BN. Shingenaga, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7915-22.
26. Ode P. Herbal insights: A close look at active constituents of medicinal hers. *SOFW Journal* 1995;121:8-11.
27. Wu Y, Blum D, Nissou MF, Benabid AL, Verna JM. Unlike MPP+, apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells is independent of mitochondrial inhibition. *Neuroscience Lett* 1996; 221:69-71.
28. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1988;240:1302-9.
29. Kaiser W. The effect of hydrogen peroxide on CO_2 fixation of isolated intact chloroplast. *Biochem. Biophys Acta* 1976;440:475-82.
30. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43(2):109-42.
31. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1141-51.
32. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-64.
33. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19(5):711-21.
34. Weisz A, Cicatiello L, EsumiH. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacteria llipopolysaccharide and NG-monomethyl-L -arginine. *Biochem J* 1996;316(Pt1):209-15.
35. Crofford LJ, WilderRL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 1994; 93(3):1095-101.
36. Duerksen-Hughes PJ, Day DB, Laster SM, Zachariades NA, Aquino L, Gooding LR. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J Immunol* 1992; 149(6):2114-22.