

U937을 이용한 활성산소 유도과 염증관련 아라키돈산 유리에 있어 은행잎 엑스의 억제 효과

강 상 모
전국대학교 미생물공학과

Effect of Inhibitions of Ginkgo biloba Extracts on Induction of Reactive Oxygen Species and Release of Inflammation Mediator Arachidonic Acid from U937

Sang-Mo Kang
Department of Microbiological Engineering, Konkuk University

Abstract

Effect of inhibitions of three kinds of Ginkgo biloba extracts(Ginkgo biloba extract, Ginkgolide A, and Ginkgolide B) on induction of reactive oxygen species and release of inflammation mediator arachidonic acid were tested. Three kinds of Ginkgo biloba extracts could not inhibit the pyrogallol auto-oxidation, but they showed the hydrogen atom donating activity in DPPH assay. When 10 μ M hydrogen peroxide and 400 μ g/mL of three kinds of Ginkgo biloba extracts were added to U937 monocytic macrophage, the induction of lipid peroxidation was not observed. The Ginkgo biloba extract showed the most powerful inhibition among the extracts. And only Ginkgolide A was good for the inhibition of the protein degradation. The release of inflammation mediator arachidonic acid was induced by adding TPA and calcimycin to U937. In this assay, even 10 μ g/mL of three different Ginkgo biloba extracts excellently blocked the release of arachidonic acid. Particularly, the inhibition efficiency of Ginkgolide B was about 11 times higher than that of induction, and was about 4 times higher than that of the control of noninduction. This result suggests that the release of arachidonic acid is not inhibited by the antioxidant activity of Ginkgo biloba extracts, but a pre-step of the release of arachidonic acid is inhibited by Ginkgo biloba extracts.

Key words : Ginkgo biloba, Ginkgolide, reactive oxygen species, arachidonic acid

서 론

산소를 전자전달계의 수용체로 사용하는 모든 생물체들은 정상적인 대사 과정에서 사용하는 산소중 약 1%정도는 불완전하게 환원되어 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 생성한다. 생성된 활성산소종은 반응성이 대단히 높아서 세포내의 발생된 주변 장소의 거대 분자들을 변형시키게 된다⁽¹⁾. 그러나 이러한 활성산소의 소량은 체내에서 면역 활동, 신호 전달 등의 생명에 필수적인 역할을 하기도 한다⁽²⁾.

일반적 대사 상황에서 발생하는 활성산소종은

superoxide(O_2^-)이며, 이로부터 과산화수소, hydroxyl radical($HO\cdot$), peroxy radical($RO_2\cdot$) 등으로 파생형을 생성한다. 이 중에서 과산화수소는 생체막을 자유로이 투과하며 transition metal ion과 Fenton 반응에 의하여 가장 강력한 반응성을 갖는 hydroxyl radical로 전환된다⁽³⁾.

활성산소종은 생체막의 불포화지방산으로부터 전자를 추출하여 자신은 안정화되나, 전자를 빼앗긴 물질은 lipidyl radical($L\cdot$)이라는 유리 라디칼의 형태가 된다. Lipidyl radical은 곧 산소와 결합하여 peroxy radical($LOO\cdot$)로 된 후, 주변 지질로부터 전자를 빼앗아 $LOOH$ 의 변성된 형태로 안정화되고 전자를 빼앗긴 지질은 다시 lipidyl radical이 되어 위의 과정을 반복하는 연쇄 반응이 일어난다⁽⁴⁾. 단백질은 활성산소종에 의해서 산화되어 그 자체의 활성을 잃게 되며, 이런 변성된 단백질은 natural protease에 좀 더 민감한 형태

Corresponding author : Sang-Mo Kang, Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Hwayang-dong 1, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
Tel : 02-450-3524
Fax : 02-450-3517
E-mail : kangsm@kkucc.konkuk.co.kr

로 변하여 빠르게 분해된다⁽⁵⁾.

염증의 경우 활성산소에 의해 세포막의 지질이 과산화되고 단백질이 분해되면, 세포막의 구조를 유지하지 못하여 세포막의 칼슘 이온 채널의 변화가 일어난다. 이러한 변화로 인해 세포 내의 칼슘 유입이 증가하면, 칼슘 이온의 촉매로 phospholipase A₂가 활성화되어 세포막에서의 아라키돈산(arachidonic acid)의 유리가 증가하게 된다⁽⁶⁾. 아라키돈산은 탄소수 20인 다중 불포화 지방산으로 세포막 인지질에 존재하며, cyclooxygenase와 lipoxygenase에 의해 여러 종류의 eicosanoid로 전환되는데, 전환된 물질중 prostaglandin은 염증과 면역 반응에 주된 역할을 한다⁽⁷⁾.

한편, 은행은 맛이 달고 성질은 차며 폐경에 작용하며⁽⁸⁾, 주로 은행잎 엑스로 시판된다. 이 추출물에는 Ginkgolide A, Ginkgolide B, quercitin, kaempferol 등의 성분들이 함유되어 있으며 혈액 순환 개선제로 사용된다⁽⁹⁾. 은행잎 엑스의 구성성분인 quercitin, kaempferol 등의 flavonoid는 superoxide anion scavenger, singlet oxygen quenchers로 작용한다⁽¹⁰⁾. 은행잎과 은행잎 엑스 성분인 Ginkgolide A와 B는 현재 지질과산화의 연쇄 반응을 억제함으로써 항산화능을 발휘하는 우수한 물질인 것으로 보고되고 있다⁽¹¹⁾. 그리고 은행잎 엑스는 망막상처로 야기되는 염증을 억제하며⁽¹²⁾, 염증의 매개자^(13,14)인 혈소판 활성화인자의 저해기능을 가지고 있다⁽¹⁵⁾.

본 연구에서는 여러 가지 유리 라디칼 중에서, 가장 강력한 hydroxyl radical을 생성하는 과산화수소로 세포 사멸을 유발시켰다. 여기서 발생하는 활성산소와 염증관련 아라키돈산 유도를 은행잎 엑스 3종류가 얼마나 억제하는지 검토하였다.

실험 및 방법

시료 제조

Ginkgolide A, B 표품을 Sigma사에서 구입하여 메탄올에 10 mg/mL의 농도로 가용화한 후 0.2 µm filter에 여과하여 사용하였다. 은행잎 엑스(extract)는 시중 제품을 10 mg/mL 에탄올의 농도로 추출하여 사용하였다.

동물 세포 배양

실험에 사용한 세포는 human monocytic macrophage인 U937⁽²¹⁾이며, 사용 배지는 Dulbecco's modified eagle medium(GIBCO) 9%, fetal bovine serum(GIBCO) 10%, penicillin-streptomycin(10,000 µ pen/

mL, 10,000 µg strep/mL) 1%이며, 5% CO₂, 95% 공기, 37°C 배양기에서 배양하였다.

은행잎 엑스의 항산화력

은행잎 엑스의 superoxide anion 소거능: 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 150 µL에, 은행잎 엑스 30 µL를 첨가한 후 7.2 mM pyrogallol 30 µL를 넣고 초기 흡광도를 측정된 후, pyrogallol 자동 산화에 의해 생성되는 superoxide anion을 은행잎 엑스가 소거하여 나타나는 흡광도로부터 차를 측정하여 소거 농도(scavenging concentration, SC₅₀)로 나타내었다⁽¹⁶⁾.

은행잎 엑스의 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)에의 전자공여능: 산화 형태인 DPPH가 은행잎 엑스의 전자 공여능에 의해 환원되는 정도를 Tomohiro의 방법⁽¹⁷⁾을 변형하여 분광 광도계 분석으로 측정하였다. 16 mg DPPH/100 mL 에탄올과 0.1 M sodium acetate 완충액(pH 5.6)을 동량 혼합한 용액 1.9 mL에 은행잎 엑스 0.1 mL을 첨가한 후 15분간 실온에서 반응시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

은행잎 엑스의 세포 독성

은행잎 엑스의 세포 독성을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromid(MTT) assay⁽¹⁸⁾를 이용하여 측정하였다. U937을 계대배양 후 대수증식기에 도달하였을 때 2×10⁴ cells/well의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 세포를 loading한 후 은행잎 엑스를 농도별로 첨가하여 3시간 배양하고 배양액을 10% MTT(5 mg/mL)가 첨가된 새 배지로 교체하여 3시간 반응시켰다. 배양액을 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO로 용해한 후 흡광도를 측정하고 대조군의 생육도를 100%로 하여 세포의 상대활성을 나타내었다.

과산화수소에 의한 세포주의 지질 과산화 유도

세포주의 지질 과산화 정도를 측정하기 위해 Yagi 등의 방법⁽¹⁹⁾을 변형하여 thiobarbituric acid(TBA)와의 반응 물질을 통하여 96-well plate에서 정량분석하였다. 2×10⁴ cells/well의 세포를 96-well plate에 loading한 후 배지에 10 µM 과산화수소를 첨가하여 3시간 배양시켰다. 배양 후 세포를 lysis 완충액(1% Triton X-100 containing phosphate buffered saline, pH 7.4) 20 µL로 파쇄, 현탁시킨 후 TBA(1%) 150 µL와 초산 150 µL을 첨가하여 100°C oven에서 30분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 1,1,3,3-tetraethoxy propane(malondialdehyde)을 사용하여 시료의 흡광도와 표준곡선을 작성하여 비교 정량하였다.

과산화수소에 의한 세포주의 단백질 분해 유도

세포주의 단백질 분해 정도는 Davies 등의 방법⁽⁹⁾을 응용하여 96-well plate에서 측정하였다. 2×10^4 cells/well 농도의 세포를 96-well plate에 loading한 후 배지에 10 μ M 과산화수소를 첨가하여 3시간 배양하였다. 배양 후 세포를 lysis 완충액(1% Triton X-100 containing PBS, pH 7.4) 200 μ L에 파쇄, 현탁시킨 후 20% TCA 100 μ L를 첨가하여 상층액을 취해 시료액과 단백질 정량용으로 사용하였다. 원심분리 후 상층액 0.25 mL에 HEPES 완충액(pH 9) 1.25 mL, fluorescamine 0.5 mL를 첨가하여 25°C에서 20분간 반응시킨 후 형광분광 광도계를 이용하여 excitation 390 nm, emission 475 nm에서 형광도를 측정하였다. Bovine serum albumin을 이용하여 표준곡선을 작성, 비교, 정량하였다.

은행잎 엑스에 의한 U937에서의 아라키돈산 유리 억제

은행잎 엑스를 이용하여 세포로부터 아라키돈산 유리 저해능을 gas chromatography를 이용하여 측정하였다. 대수기의 U937에 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA, 1 μ M)를 첨가하여 세포를 분화시킨 후 은행잎 엑스(10 μ g/mL)를 넣고 20시간 배양하였다. 이 세포에 calcium ionophore A23187(1 μ M)을 첨가하여 2시간 배양한 후 세포를 회수하여 PBS(pH 7.4)로 2번 washing한 후 lysis 완충액(1% Triton X-100 containing PBS, pH 7.4)을 이용하여 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 chloroform : 메탄올(1 : 2, v/v)로 지질만을 추출 정제하여 BF₃ : 메탄올 : hexane(v/v 25 : 55 : 20) 용액 5 mL를 첨가하여 methylation시켰다. 여기에 0.5 mL hexane, 2 mL 증류수를 첨가하여 methylation된 유리 지방산을 얻어 동량의 hexane에 용해하여 시료로 사용하였다. GC의 분석으로 Shimazu corp. GC-A를 사용하였고, 이때 분석조건은 BPX-5(Φ 0.22 mm \times 50 m) column과 FID detector를 사용하였으며, injector 온도는 250°C로 하고, detector 온도는 300°C로 하였다. Column 온도는 140°C(0 min)에서 270°C(20 min)까지 4°C/min 증가시키도록 programing하였고, carrier gas는 N₂ gas (gas flow rate, 200 kPa)를 사용하였다⁽²⁰⁾.

결과 및 고찰

은행잎 엑스의 항산화력

은행잎 엑스의 superoxide anion 소거능: 염증은 활성산소와 깊은 관계가 있으므로⁽¹⁸⁾, pyrogallol 자동산화로 생성되는 superoxide anion radical을 은행잎 엑스

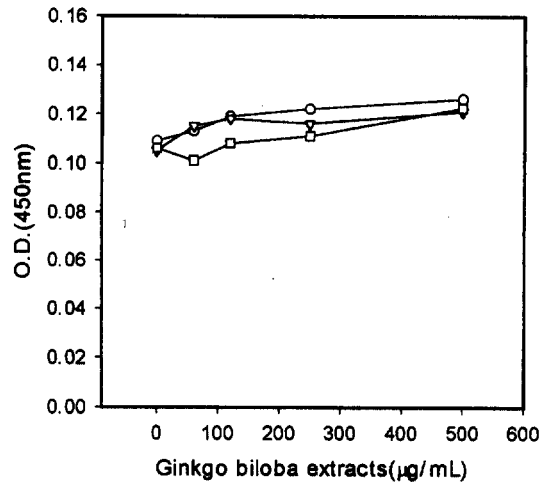


Fig. 1. Superoxide scavenging activity of Ginkgo biloba extracts.

Symbols: ○, Ginkgolide A; ▽, Ginkgolide B; □, Ginkgo biloba extract.

가 얼마나 소거하는가를 측정하였다. Pyrogallol은 자동 산화되어 pyrogallate가 되면서 생성된 superoxide anion radical은 pyrogallol을 더욱 산화시킨다. 실험에 사용된 은행잎 엑스에 superoxide anion을 제거할 수 있는 물질이 함유되어 있다면 pyrogallol의 자동 산화를 억제하여 흡광도의 증가를 줄일 수 있을 것이다. 은행잎 엑스 3종류를 이용하여 pyrogallol 자동 산화로 생성된 superoxide anion의 소거능의 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 은행잎 엑스에 포함되어있는 여러 가지 flavonoid는 superoxide anion radical 소거능이 우수하다고 보고되어 있다^(10,21). 그러나 이러한 보고와는 상이하게 Ginkgolide A, B와 은행잎 엑스는 측정범위내에서는 superoxide anion의 소거능이 나타나지 않았다. 이것은 은행잎 엑스의 소수성으로 인하여 pyrogallol 자동산화에서는 항산화능력을 발휘할 수 없었기 때문으로 생각된다.

은행잎 엑스의 전자 공여능: 여기서는 은행잎 엑스가 항산화능의 하나의 방법인 전자공여능이 있는가를 보았다. DPPH는 free radical form으로 발색단을 형성하게 되며, 이는 외부에서 전자를 공여할 수 있는 물질이 첨가되면 안정된 형태로 변형된다. Fig. 2는 은행잎 엑스 3종류의 농도 의존성 전자공여능을 측정된 결과이며, 초기 DPPH의 흡광도는 2.3이었으나 은행잎 엑스의 전자공여능에 의해 DPPH가 환원되어 흡광도가 낮아지는 것을 볼 수 있다. Ginkgolide A, B는 300 μ g/mL의 농도에서 DPPH를 초기보다 약 1.43배 환원시켰으며, 은행잎 엑스는 1.25배 환원력을 나타냈다.

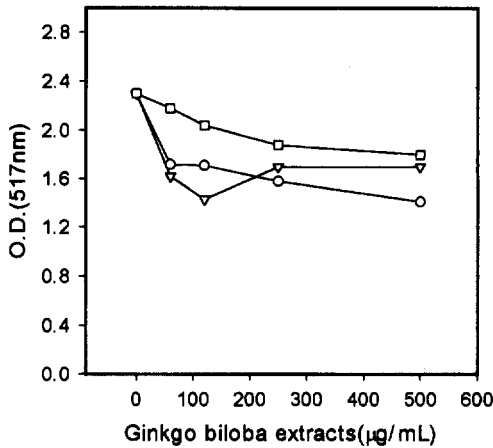


Fig. 2. Hydrogen atom donating activity of Ginkgo biloba extracts in DPPH assay.

Symbols were the same as Fig. 1.

이상의 결과를 바탕으로 전자공여능 방법으로 측정 시, Ginkgolide A, B는 은행잎 엑스보다 항산화력이 더 높은 것을 알 수 있었다. 그리고 이와 같이 은행잎 엑스 3종류 모두가 전자공여에 의한 항산화능을 갖는 것은 반응액의 50%가 에탄올이므로 소수성인 은행잎 엑스가 그 기능을 어느 정도 발휘하였기 때문으로 생각 된다.

과산화수소의 세포 독성

과산화수소는 생체막을 자유로이 투과하여 transition metal ion과 Fenton 반응에 의하여 가장 강력한 반응성을 갖는 hydroxyl radical로 전환된다⁽³⁾. Iwata 등⁽²²⁾은 과산화수소가 농도 의존적으로 신경 세포주(B50)를 사멸시키는 것을 보고하였다. 이러한 보고를 바탕으로 과산화수소를 첨가하여 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl radical에 의한 U937 세포의 사멸정도를 MTT assay를 통해 측정하였다.

염증에서는 지질과산화와 단백질변성이 나타나기 때문에⁽¹⁸⁾, 은행잎 엑스가 과산화수소로 유도되는 세포의 지질과산화와 단백질 분해를 어느 정도 억제하는가를 보기 위하여 과산화수소의 첨가 농도를 검토하였다. Fig. 3에 의하면 과산화수소의 농도에 비례적으로 hydroxyl radical에 의해 U937 세포가 사멸하는 것을 알 수 있으며, 세포 사멸 50% 농도인 IC₅₀은 10 µM이었다. 이상의 실험을 바탕으로 과산화수소에 의한 U937 세포주의 지질과산화와 단백질 분해의 유도는 10 µM 과산화수소를 사용하기로 하였다.

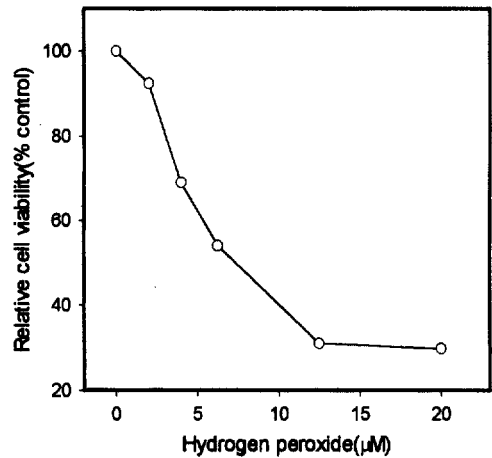


Fig. 3. Relative cell cytotoxicity of hydrogen peroxide. U937 was used.

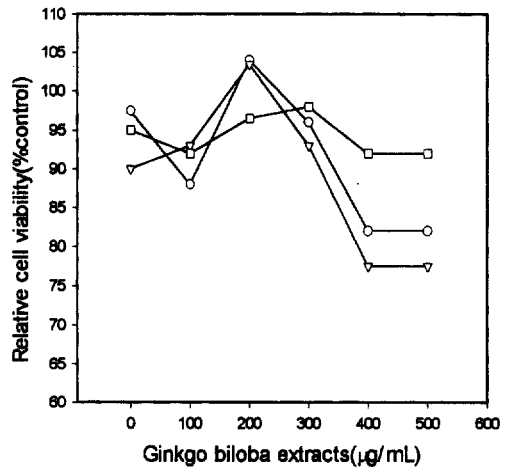


Fig. 4. Relative cell cytotoxicity of Ginkgo biloba extracts. Symbols were the same as Fig. 1.

은행잎 엑스의 세포 독성

앞에서 과산화수소의 첨가 농도를 결정하였는데, 여기서는 은행잎 엑스의 첨가 농도 범위를 조사하기로 하였다. 그 이유는 대부분의 천연 물질은 고농도에서 세포 독성을 나타내기 때문이다. 따라서 U937 세포주를 이용한 실험에서는 첨가되는 은행잎 엑스가 세포 생육에 영향을 주지 않는 범위 내에서만 실험이 가능하다고 볼 수 있다. 은행잎 엑스 자체의 세포 독성을 측정하기 위해서 U937에 대한 세포 독성을 MTT assay를 이용하여 측정하였다. Fig. 4는 3종류의 은행잎 엑스에 의한 세포 사멸을 측정된 결과이다. Ginkgolide A와 B는 400 µM 농도 이상에서 23%의 세포 사멸을

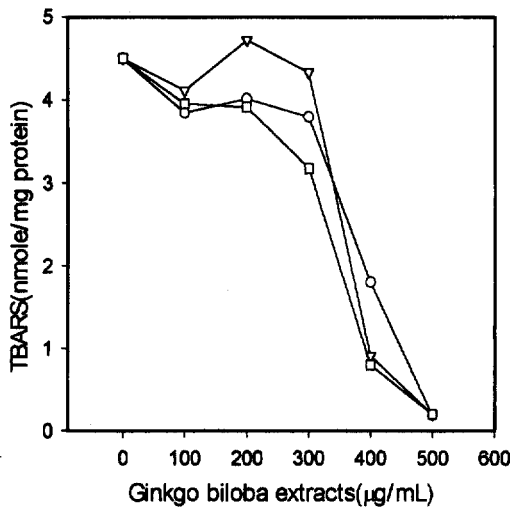


Fig. 5. Malondialdehyde levels in U937 added hydrogen peroxide.

Symbols were the same as Fig. 1.

을 나타내었지만 은행잎 엑스는 실험 범위 내에서는 세포 독성을 유발하지 않았다. 따라서 은행잎 엑스는 적어도 500 µM까지는 세포에 첨가 시 독성을 배제시키면서 실험이 가능한 것을 알았다. Ginkgolide A와 B는 300 µM 농도 범위로 세포에 첨가시 독성을 배제시키면서 실험이 가능한 것을 알았으며, 400 µM 이상에서도 지질과산화와 단백질 분해 억제능의 경향은 알 수 있을 것으로 생각되었다.

은행잎 엑스의 과산화수소에 의해 유도된 지질과산화의 억제능

염증시 지질과산화가 나타나는 것⁽¹⁸⁾을 바탕으로 위에서 결정된 10 µM 과산화수소에 의한 세포의 지질과산화 유도 시, 은행잎 엑스 3종류가 어느 정도 지질과산화를 억제하는지 보았다. Fig. 5가 그 결과이다. Hydroxyl radical에 의해 생성된 U937 세포에서의 지질과산화를 각각의 첨가 농도 300 µg/mL에서, 무첨가에 비하여 은행잎 엑스는 약 29%를, Ginkgolide A는 약 16%를 감소시켰으나, Ginkgolide B는 억제시키지 못하였다. 그러나 400 µg/mL에서는 은행잎 엑스는 약 85%를, Ginkgolide B는 80%를, Ginkgolide A는 60%를 감소시켰다.

한편, 활성산소종에 의해 생성된 생체내 지질 과산화물은 분자내의 peroxide 결합을 갖는 지질의 총칭으로 2차 산물로 malondialdehyde를 생성한다. Colak 등⁽¹⁰⁾은 은행잎 엑스를 rat에 경구 투여하였을 경우 조직내 malondialdehyde 수준이 감소였고, catalase

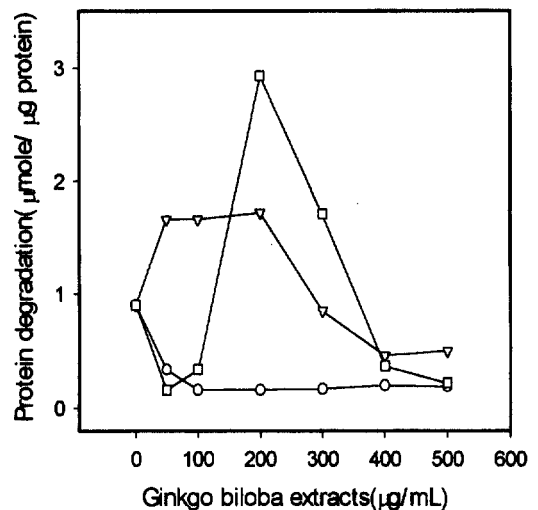


Fig. 6. Protein degradation levels in U937 added hydrogen peroxide.

Symbols were the same as Fig. 1.

activity는 증가하였다고 보고하였다. 또한, Kose 등⁽²³⁾은 과산화수소에 의해 유도된 적혈구의 지질과산화를 은행잎 엑스가 항산화능으로 억제한다고 보고하였고, Hibatallah 등⁽²⁴⁾은 은행잎 엑스가 hydroxyl radical을 소거하고 지질과산화를 억제하는 효과가 있다고 보고하였다.

이와 같은 보고들에서와 같이 본 실험에서도 은행잎 엑스 3종류가 비록 고농도에서이긴 하지만 지질과산화 억제능을 갖는 것을 알 수 있었으며, 이로부터 은행잎이 염증 억제능이 있을 것이라는 것을 간접적으로 알 수 있었다. 그리고 은행잎 엑스의 지질과산화 억제능이 두드러진 것은 은행잎 엑스에 다량 함유된 flavonoid에 기인한 것으로 추측되었다.

은행잎 엑스의 과산화수소에 의해 유도된 단백질분해 억제능

염증반응시 단백질 변성이 나타나는데⁽¹⁸⁾, 이러한 변성은 과도한 활성산소에 의해 유도될 수 있으며, 활성산소는 세포 구성분인 지질뿐만 아니라 단백질도 산화시켜, 효소 활성 능력의 손상, histidine 잔기의 손실, 표면 소수성의 변화, 단백질의 UV spectrum의 변화 등 많은 영향을 미친다. 이러한 산화적 손상을 받은 단백질은 natural protease에 좀더 민감한 형태로 변환되어 아미노산으로 분해된다⁽⁵⁾.

이와 같이 염증 시 단백질이 변성된다는 것을 바탕으로, 앞에서 결정된 10 µM 과산화수소에 의한 세포의 단백질 분해를 은행잎이 어느 정도 억제하는지에

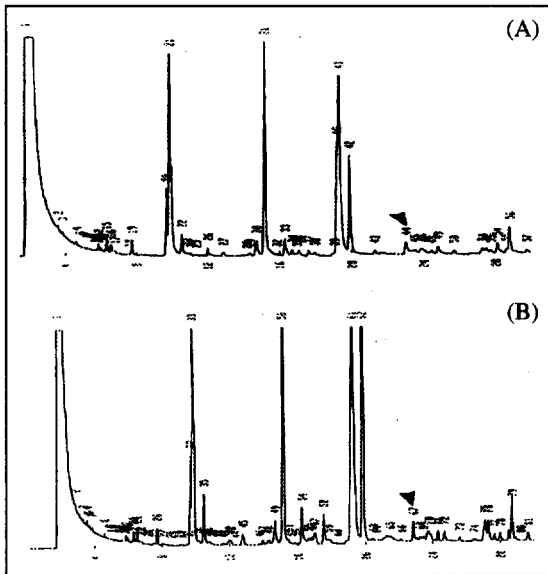


Fig. 7. Free fatty acid analysis of U937 by gas chromatography.

A, free fatty acid of control, peak 44 was the arachidonic acid; B, free fatty acid of cell that was stimulated by TPA and calcimycin, peak 67 was the arachidonic acid.

대한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Ginkgolide A는 50 µg/mL 농도이상에서 단백질 분해를 억제하였고, Ginkgolide B는 300 µg/mL 농도까지는 오히려 유도하다가, 400 µg/mL 이상에서는 억제하였다. 은행잎 엑스는 첨가농도에 따라 심한 편차를 나타내는 경향을 보였다. 여기서 은행잎 엑스의 종류에 따라 그리고 농도에 따라 단백질의 분해를 억제 혹은 유도하는 것을 알았으며, 은행잎 엑스와 Ginkgolide B의 400 µg/mL 첨가의 효과를 볼 때, 은행잎 엑스 3종류가 염증 억제능이 있다는 것을 미약하나마 간접적으로 알 수 있었다.

은행잎 엑스에 의한 U937에서의 아라키돈산 유리 억제 염증은 아라키돈산을 매개로 하므로 아라키돈산 유리량은 염증에 있어 매우 중요하다고 본다. 활성산소 종은 결국 아라키돈산 유리를 유도하고, 또한 활성산소는 아라키돈산 cascade를 통해 생성될 수 있다⁽⁷⁾. Rzigalinski 등⁽²⁵⁾은 TPA로 분화된 U937을 calcium ionophore A 23187(calcimycin)으로 처리하면 아라키돈산을 유리한다고 보고하였다.

따라서, 염증 매개체인 아라키돈산 유리를 은행잎 엑스가 어느 정도 억제하는지를 검토하였다. Fig. 7의 A는 U937 세포의 유리 지방산 pattern이고, Fig. 7의 B는 TPA와 calcimycin으로 유도된 U937에서의 유리

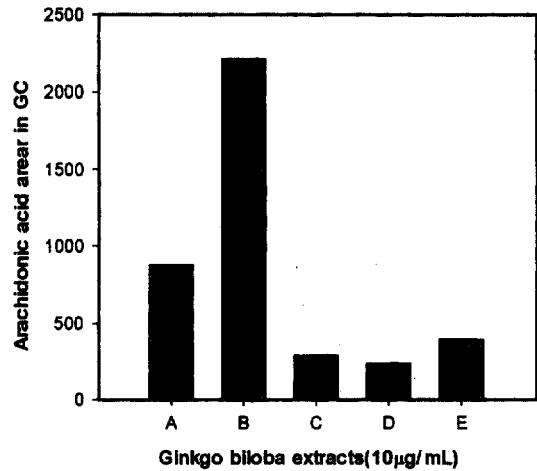


Fig. 8. Inhibitions of Ginkgo biloba extracts on release of arachidonic acid.

Lane A, control; lane B, cell treated with TPA and calcimycin; lane C, cell treated with TPA, calcimycin and Ginkgolide A; lane D, cell treated with TPA, calcimycin and Ginkgolide B; lane E, cell treated with TPA, calcimycin and Ginkgo biloba extract.

지방산 pattern이다. TPA와 calcimycin을 첨가하지 않고 은행잎 엑스만을 첨가하였을 경우의 아라키돈산 유리에는 유의적 차이가 나타나지 않았다(Data not shown).

Fig. 8은 TPA와 calcimycin으로 U937을 자극하여 아라키돈산 유리를 유도한 후 3종류의 은행잎 엑스를 첨가하였을 때의 아라키돈산 유리량을 측정한 결과이다. 아라키돈산 유리를 유도한 경우에 비하여, Ginkgolide A 첨가 시는 약 7배, Ginkgolide B 첨가 시는 약 11배, 은행잎 엑스 첨가 시는 약 4.4배가 감소하여 뛰어난 유리 억제능을 보였다. 그리고 은행잎 엑스 3종은 모두 TPA와 calcimycin으로 U937을 자극하지 않은 대조군보다도 현저히 낮은 아라키돈산 유리 억제능을 보였는데, Ginkgolide B의 경우는 대조군에 비하여도 약 4배의 억제능을 보였다.

이와 같은 결과로 볼 때 은행잎 엑스 3종류는 아라키돈산 유리를 억제하므로 염증을 억제한다고 볼 수 있다. 보통 은행잎 엑스는 혈액순환 개선제로 가장 많이 사용하는데 혈액순환에는 활성산소를 제거하는 은행잎 엑스가 좋다는 보고가 많다^(13,14). 따라서 은행잎 엑스는 활성산소를 제거하고⁽²³⁾ 이로 인한 염증을 억제하여 혈액순환이 좋아진다고 볼 수도 있다.

그러나 아라키돈산 유리 억제 실험에서는 은행잎 엑스 3종 모두 앞의 실험들에서와는 대조적으로 낮은 10 µg/mL 농도로 첨가하였음에도 불구하고 억제능이

뛰어났다. 이것은 은행잎 엑스가 활성산소 생성, 지질 과산화 생성을 억제하는 기능보다 아라키돈산 유리를 억제하는 기능이 뛰어난 것을 나타낸다고 생각된다. 따라서 아라키돈산 유리 억제는 활성산소 생성, 지질과산화 생성의 억제로 나타나는 것이 아니고, 아라키돈산 유리의 어느 전 단계, 예를 들면 phospholipase A₂ 와 같은 효소를 저해할 가능성이 있다고 생각된다. 이러한 아라키돈산 유리에 있어, 은행잎 엑스는 전 단계의 어느 부분을 강력히 저해하여 아라키돈산이 제한적으로 유리되므로 염증이 억제되고 혈액순환이 좋아진다고 생각된다.

따라서 은행잎 엑스가 활성산소에 의해 나타나는 염증 기작의 어느 전 단계를 저해하여 아라키돈산 유리까지 억제되는지 더욱 연구가 필요하다고 본다.

요 약

은행잎 엑스 3종류를 이용하여 활성산소와 염증관련 아라키돈산 유리의 억제능을 보았다. 은행잎 엑스, Ginkgolide A, Ginkgolide B의 3종류 모두 pyrogallol 자동산화에서는 항산화능을 발휘하지 못하였으나, DPPH 법의 전자공여능에서는 환원력을 나타내었다. 10 µM 과산화수소(IC₅₀ = 10 µM)로 U937의 지질과산화 유도 시 은행잎 엑스 3종류 모두 400 µg/mL 이상에서는 보호하였으나, 은행잎 엑스가 가장 좋았다. 단백질 분해 실험에서는 Ginkgolide A만이 효과가 좋아 50 µg/mL에서도 거의 억제하였다. TPA와 calcimycin을 U937에 첨가하여 염증 유도의 중요 물질인 아라키돈산 유리를 유도하였다. 이 아라키돈산 유리 유도 시 은행잎 엑스 3종류 모두 10 µg/mL에서도 뛰어난 억제능을 보였으며, 특히 Ginkgolide B는 유도 시에 비하여 11배 억제하였으며, 비유도시인 대조군보다도 약 4배의 억제능을 보였다. 따라서 은행잎 엑스가 항산화능에 의해 아라키돈산 유리를 억제하는 것이 아니라 아라키돈산 유리의 전 단계의 어느 부분을 강하게 억제하여 아라키돈산 유리가 저해되는 것으로 생각된다.

문 헌

- Bulkey, G.B. The role of oxygen radicals in human disease process. *Surgery* 94: 407-411 (1993)
- Thirry, A.M., Tassin, J.P., Blanc, G. and Glowinski, J. Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature* 263: 242-244 (1976)
- Yu T.W. and Anderson D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutat. Res.* 379: 201-210 (1995)
- Minito, G. and Aust, S.D. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipid* 27: 219-226 (1993)
- Davies, K.J.A. and Goldberg, A.L. Protein damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracted of red blood cell. *Biol. Chem.* 262: 8227-8235 (1987)
- Cane A., Breton M., Koumanov K., Berezat G. and Colard O. Oxidant-induced arachidonic acid release and impairment of fatty acid acylation in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 274 (4 Pt 1): C1040-1046(1998)
- Nazzare-Porro, M. Azelaic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17: 1033-1041 (1987)
- Goahak · Baekgoasacheon. Silyongdonguiyakhak. Ilouelseogak. p. 433-448 (1990)
- Pietta, P., Simonetti, P., Gardana, C. and Mauni, P. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites. *J. Biomed. Anal.* 23: 223-226 (2000)
- Colak, O., Sahin, A., Inal, M., Yasar, B. and Kiper, H. The effect of ginkgo biloba on the activity of catalase and lipid peroxidation in experimental strangulation ileus. *Int. J. Clin. Res.* 28: 69-71 (1998)
- Scholtyssek H., Damerau W., Wessel R. and Schimke I. Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. *Chem. Biol. Interact.* 106: 183-190 (1997)
- Beck, J.C., Goodner, C.L., Wilson, D., Glidden, D., Baskin, D.G., Lernmark, A. and Braquet, P. A platelet factor inhibitor on insulinitis in the spontaneously diabetic BB rat. *Autoimmunity* 9: 225-235 (1991)
- Schneider, B. Ginkgo biloba extract in peripheral arterial disease: meta analysis of controlled clinical trials. *Arzneimittel Forschung* 42(4): 428-436 (1992)
- Jung, F., Mrowietz, C., Kiesewetter, H. and Wenzel, E. Effect of Ginkgo biloba on fluidity of blood and peripheral microcirculation in volunteers. *Arzneimittel Forschung* 40: 589-593 (1990)
- Droy-Lefaix, M.T., Vennat, J.C., Besse, G. and Doly, M. Effect of Ginkgo biloba extract(EGb 761) on chloroquine induced retinal alterations. *Lens. Eye. Toxic. Res.* (3-4): 521-528 (1992)
- Marklund, S. and Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *J. Biochem.* 47: 469-474 (1974)
- Tomohiro, T., Kitatani, F. and Yagi, A. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by murine bacteria from fish and shellfish. *Biol. Biotech. Biochem.* 58: 1780-1782 (1994)
- Conner, E.M. and Grisham, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12: 274-277 (1996)
- Yagi, K. A simple fluorometric assay for lipid peroxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 212-216 (1976)
- Mihyeon, Bak. Oxidative Damage by stress and effects of antioxidative vitamins. Ph.D.Thesis. HanYang University. pp. 27-31 (1995)

21. Pietri, S., Maurelli, E., Drieu, K. and Culcasi, M. Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 733-742 (1997)
22. Iwata, E., Miyazaki, I., Asanuma, M., Iida, A. and Ogawa, N. Protective effects of nicergoline against hydrogen peroxide toxicity in rat neuronal cell line. *Neurosci. Lett.* 17: 49-52 (1998)
23. Kose, K. and Dogan, P. Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membranes. 1. Protective effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J. Int. Med. Res.* 23: 1-8 (1995)
24. Hibatallah, J., Carduner, C. and Poelman, M.C. In-vivo and in-vitro assessment of the free-radical-scavenger activity of Ginkgo flavone glycosides at high concentration. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 1435-1440 (1998)
25. Rzigalinski, B.A. and Rosenthal, M.D. Effects of DMSO-induced differentiation on arachidonate mobilization in the human histiocytic lymphoma cell line U937: responsiveness to sub-micromolar calcium ionophore A23187 and phorbol esters. *Biochim. Biophys. Acta.* 1223: 219-225 (1994)

(2000년 7월 30일 접수)