

개오동나무에서 抽出한 Catalposide의 抗炎 및 細胞枯死 抑制效果에 關한 研究

오천식*, 황상욱, 김영우, 송달수, 채영석, 정종길¹, 송호준, 신민교*

원광대학교 한의과대학 본초학교실, 1 : 동신대학교 한의과대학 방제학교실

Studies on the Anti-inflammatory and Anti-apoptotic Effect of Catalposide Isolated from *Catalpa ovata*

Cheon-Sik Oh*, Sang-Wook Hwang, Yong-Woo Kim, Dal-Soo Song, Young-Seok Chae, Jong-Gil Jeong¹, Ho-Joon Song, Min-Kyo Shin*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1 : Dept. of Prescriptions, College of Oriental Medicine, Dongshin University

ABSTRACT

Objectives : The use of natural products with therapeutic properties is as ancient as human civilisation and, for a long time, mineral, plant and animal products were the main sources of drugs. Catalposide, the major iridoid glycoside isolated from the stem bark of *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae) has been shown to possess anti-microbial and anti-tumoral properties. Heme oxygenase-1 (HO-1) is a stress response protein and is known to play a protective role against the oxidative injury. In this study, we examined whether catalposide could protect Neuro 2A cells, a kind of neuronal cell lines, from oxidative damage through the induction of HO-1 protein expression and HO activity. We also examined the effects of catalposide on the productions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nitric oxide (NO) on RAW 264.7 macrophages activated with the endotoxin lipopolysaccharide.

Methods : HO-1 expression in Neuro 2A cells was measured by Western blotting analysis. NO and TNF- α produced by RAW 264.7 macrophage were measured by Griess reagent and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

Results : The treatment of the cells with catalposide resulted in dose- and time-dependent up-regulations of both HO-1 protein expression and HO activity. Catalposide protected the cells from hydrogen peroxide-induced cell death. The protective effect of catalposide on hydrogen peroxide-induced cell death was abrogated by zinc protoporphyrin IX, a HO inhibitor. Additional experiments revealed the involvement of CO in the cytoprotective effect of catalposide-induced HO-1. In addition, catalposide inhibited the productions of TNF- α and NO with significant decreases in mRNA levels of TNF- α and inducible NO synthase.

Conclusions : Our results indicate that catalposide is a potent inducer of HO-1 and HO-1 induction is responsible for the catalposide-mediated cytoprotection against oxidative damage and that catalposide may have therapeutic potential in the control of inflammatory disorders.

Key Words : Catalposide, *Catalpa ovata* G. Don, Bignoniaceae.

*교신저자 : 신민교, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 063-850-6837 · E-mail : smk@wonkwang.ac.kr

#제1저자 : 오천식, 서울시 영등포구 영등포동 7가 51-6 동아한의원 · Tel : 02-2633-8273

· 접수 : 2005년 7월 23일 · 수정 : 2005년 9월 12일 · 채택 : 2005년 9월 20일

서 론

개오동나무(*Catalpa ovata* G. Don.)¹⁻³⁾는 콩소과과(紫葳科; Bignoniaceae)에 속한 落葉喬木으로서 높이 6~15m 자라며¹⁻¹²⁾, 한약재의 이름으로는 本草學文獻의 最古 原典인 《神農本草經》¹³⁾에 “梓白皮”라고 記錄된 것이 嚆矢이다. 그 뒤에 “梓白皮”^{3,5,7,10-11,14)} 외에 “梓根白皮”⁶⁾와 “梓木”^{3,5,7,10-11)}, “梓葉”^{3,5,10-11,14)} “梓實”^{7-12,15)} 등이 응용되었다.

그 동안 밝혀진 成分으로는 樹皮에는 catalposide¹¹⁾, p-hydroxybenzoic acid⁹⁾, 2-(4-hydroxyphenyl) ethyl triacontanoate¹¹⁾, 9-methoxy- α -lapachone¹¹⁾, ferulic acid¹¹⁾, 6-feruloyl catapo¹¹⁾, 6-feruloyl sucrose¹¹⁾, α -lapachone¹¹⁾, 9-hydroxy α -lapachone¹¹⁾, p-coumaric acid¹¹⁾를 含有하고; 根皮에는 isoferulic acid^{3,11)}, sitosterol^{3,11)}, p-hydroxybenzoic acid^{3,11)}를 含有하며; 木質에는 catalpalactone^{3,11)}, β -sitosterol¹¹⁾, cerotic acid¹¹⁾, vanillic acid¹¹⁾, ferulic acid¹¹⁾, p-hydroxybenzoic acid¹¹⁾, p-hydroxycinnamic acid¹¹⁾, syringic acid¹¹⁾, vanilline¹¹⁾, glucose¹¹⁾, mannose¹¹⁾, xylose¹¹⁾, rhamnose¹¹⁾, 2-(4-hydroxy phenyl) ethyl triacontanoate¹¹⁾, 1-octacosanoyl glyceride¹¹⁾, tetracosanoic acid¹¹⁾, η -hexacosyl ferulate¹¹⁾, catalponone¹¹⁾, deoxylapacho¹¹⁾, catalponol¹¹⁾, 1-menaquinone¹¹⁾, α -lapachone¹¹⁾, 4-hydroxy- α -lapachone¹¹⁾, 9-hydroxy- α -lapachone¹¹⁾, 4, 9-hydroxy- α -lapachone¹¹⁾, 8-hydroxydehydro-iso- α -lapachone¹¹⁾, 1-hydroxy-2-methyl-anthraquinone¹¹⁾, dehydro- α -lapachone¹¹⁾를 含有하고; 葉에는 p-coumaric acid³⁾와 p-hydroxybenzoic acid³⁾를 含有하며; 果實에는 catalposide^{3,11)}, catalpinoside¹¹⁾, catalpoll¹⁾, des-p-hydroxybenzoil -catalposide³⁾, p-hydroxybenzoic acid^{3,11)}, citric acid^{3,11)}를 含有하고; 또 種子에는 p-hydroxybenzoic acid³⁾, β -sitosterol³⁾ 등을 含有한다.

藥理作用으로는 葉의 冷浸液, 溫浸液은 黃色葡萄球菌, 大腸菌, aerogenes에 대한 抑制作用이 있으며^{3,10)}, 果實의 水溶性 抽出物 및 果皮와 種子의 抽出物은 Rat와 家兔에 대해서 利尿作用을 갖는 동시에 電解質의 排出를 增加시키고 아울러 果實에서 利尿作用을 갖는 配糖體가 抽出되고 있다. Rat의 利尿實驗에서는 des-p-hydroxybenzoil-catalposide의 作用은 catalposide보다도 強하며 前者는 주로 natrium, 後者는 chlorine ion 利尿作用이 있다^{3,10)}.

개오동나무는 韓醫學 臨床에서 炎症性 疾患에 應用

되어 왔으나 實驗的 抗炎 및 細胞枯死 抑制 效果에 대한 報告는 接하지 못하였다.

그러므로 著者는 개오동나무의 樹皮와 果實에서 Catalposide를 抽出·分離한 뒤에 이들이 抗炎 및 抗酸化 效果에 어떠한 影響을 미쳤는지 그 機轉과 細胞枯死를 抑制하는 效果의 生理活性을 檢索하고 이러한 作用에 대한 生化學的 機轉을 調查한 結果 智見을 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 實驗에서 使用된 개오동나무는 全羅北道 益山市 周邊의 庭園에 栽植한 것을 채취하여 陰乾한 뒤에 썼어 서 使用하였다.

2. 방법

1) 시료제조

精選된 개오동나무는 500.0 g을 메탄올 2.0 L로 2 時間 還流抽出하여 濾過한 다음, 메탄올 1 L를 사용하여 1 時間동안 還流抽出하였다. 처음 抽出液과 2回의 抽出液을 舍하여, 이를 減壓濃縮하여 106.78g (21.36%)를 얻었다. 이 메탄올 抽出物 (MEM) 10g은 投與濃度에 따라 稀釋하여 使用하였고, 나머지 MEM으로부터 catalposide 와 specioside를 純粹分離하였다. 각 化合物의 純粹分離 및 構造確認은 圓光大學校 醫藥資源 研究센터에서 遂行하였다.

2) 세포배양

귀의 神經細胞珠인 Neuro 2A 細胞와 大食細胞珠인 RAW 264.7 細胞는 ATCC에서 구입하여, 5% CO₂/95% air 培養基에서 熱에 의해서 非活性된 10% fetal bovine serum (Gibco 社)가 包含된 Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM, Sigma 社)와 RPMI-1640 (Sigma 社) 培養液으로 培養하여 實驗目的에 따라 使用하였다.

3) 세포생존능력 측정

細胞生存能力은 MTT (Sigma 社) 分析方法을 利用하여 ELISA 分析器로 吸光度 570 nm에서 測定하였다. 50 μ L의 MTT 反應溶液 (0.05g MTT/50mL PBS)을 各 實驗群에 處理한 다음 4 時間 동안 培養하고, 反應하지 않은 MTT 溶液을 버리고 生存細胞에 의한 MTT 反應結果로 生成된 formazan을 DMSO로 溶解하여 細胞生存 率을 間接적으로 計算하였다.

4) TNF- α 분비량 측정

RAW 264.7 細胞를 LPS (Sigma 社)로 刺戟하여 分泌된 TNF- α 量은 商用되는 「TNF- α assay kit」 (R&D System)를 使用하여 製造者가 提供하는 protocol에 따라서 測定하였다.

5) mRNA 추출

mRNA는 細胞를 PBS로 세 번 洗滌한 後에 TRIzol(TM) (Molecular Research Center) 試藥과 製造者가 提供하는 protocol에 따라 分離하였다.

6) RT-PCR 분석

1 mM dNTPs, 1.75 U/ μ RNase 抑制酵素, 2.5 U/ μ 의 M-MLV 逆傳寫 酵素 (Promega 社), 25 U/ μ 의 올리고(dT) 프라이머, 抽出된 25 ng RNA, 5 mM MgCl₂ 및 PCR 緩衝液 (5 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3)을 含有하고, 全體 20 μ L을 갖는 逆傳寫 反應 混合液을 製造한다. 以後, 製造된 逆傳寫 反應 混合液은 常溫에서 10분 동안 培養한 後 thermal cycler를 利用하여 逆傳寫 反應을 遂行한다. 逆傳寫 反應條件은 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 94 $^{\circ}$ C에서 3분으로 한다. 一次 cDNA을 生成한 後 反應 튜브는 얼음에 5분 동안 放置한 後 PCR 反應에 利用한다. PCR 反應溶液은 2.5 U의 AmpliTagTM DNA 폴리머라아제 (Promega 社), 센스 프라이머와 안티센스 프라이머 5 μ g/ μ L, 逆傳寫 反應溶液 20 μ L, 2 mM MgCl₂ 및 PCR 緩衝液, 最終 100 μ L를 含有한다. PCR 反應은 GeneAmp PCR 시스템(Perkin Elmer 社)을 利用하여 遂行하며, PCR 反應條件은 사이클 遂行前에 94 $^{\circ}$ C에서 5분, 60 $^{\circ}$ C에서 5분 및 70 $^{\circ}$ C에서 90초 前 處理하고 94 $^{\circ}$ C에서 變性(denaturation) 45초, 60 $^{\circ}$ C에서 어닐링(annealing) 45초 및 75 $^{\circ}$ C에서 擴張(extension) 90초의 사이클로하며 IL-8 및 MCP-1 cDNA에 대해서는

25 사이클 遂行하며, β -actin에 대해서는 20 사이클 遂行한다. 마지막 사이클은 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 60 $^{\circ}$ C에서 45초, 및 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 더 反應시킨다. 약 0.05 내지 0.2 볼륨의 RT-PCR 反應產物은 2.5% 아가로스 겔에서 電氣泳動 後에 에티디움 브로마이드(Sigma 社)로 染色하고, UV를 利用하여 核酸增幅을 確認한다. RT-PCR 分析에 使用된 프라이머는 下記와 같고 모두 고마바오텍에 合成을 依頼하여 購入하였다.

iNOS	(sense)	:
5'-CATGGCTTGGCCCTGGAAGTTTCTCTCAAAG-3'		
iNOS	(antisense)	:
5'-GCAGCATCCCCTCTGATGGTGCCATCG-3'		
TNF- α	(sense)	:
5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGC-3'		
TNF- α	(antisense)	:
5'-CCAAAGTAGACCTGCCCGGACTC-3'		
β -actin	(sense)	:
5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3'		
β -actin	(antisense)	:
5'-AGCCACTCCACACAG-3'		

7) Western blot 분석

細胞를 protease inhibitor 혼합물 (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mg/ml aprotinin, 5 mg/ml pepstatin A 및 1 mg/ml chymostatin)이 포함된 20 mM Tris HCl buffer (pH 7.4)로 溶血시켰다. Lowry protein assay kit (P5626, Sigma)를 이용하여 蛋白質을 定量하였다. 同量의 蛋白質 試料를 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 分離하고 Hybond enhanced chemiluminescence (ECL) nitrocellulose membrane (Amersham)으로 轉移하였다. Membrane을 5% skim milk로 blocking 하고 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology) 및 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 결합시킨 다음 標識하여 目的하는 蛋白質의 發顯 與否를 判定하였다

8) Heme Oxygenase Activity 測定

Heme oxygenase 酵素 活性는 다음과 같은 方法으로 測定하였다. 細胞로부터 分離한 마이크로솜 (microsomes)을 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, biliverdin reductase의 source로서 rat liver cytosol을 그리

고 hemin substrate가 포함된 反應 混合物에 넣었다. 그리고 37°C에서 1時間 동안 反應시켰으며 1 mL의 chloroform을 첨가하여 反應을 終結시켰다. 抽出된 bilirubin의 량은 464 nm와 530 nm 파장에서 吸光度의 차이로 計算하였다.

실험결과

1. 개오동나무에서 抽出한 catalposide가 RAW 264.7 細胞의 生存率에 미치는 影響

개오동나무의 樹皮와 果實에서 抽出한 catalposide가 RAW 264.7 細胞의 生存에 影響을 미치는지에 關한 實驗을 MTT 分析方法을 利用하여 수행하였다. RAW 264.7 細胞에 LPS 1 µg/mL을 處理하였을 때 細胞生存率이 22.24% 이었다.

그러나 개오동나무의 樹皮와 果實에서 抽出한 catalposide를 處理하였을 경우 濃度 依存的으로 LPS에 의한 RAW 264.7 細胞의 毒性이 減少하였다(Fig. 1).

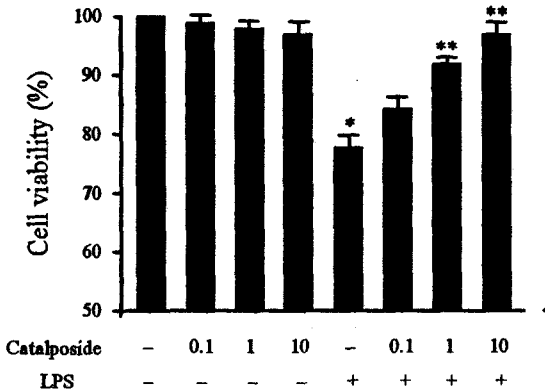


Fig. 1. Effects of catalposide on the viability of RAW 264.7 cells. The cells were incubated for 24 h with medium (containing 0.1% DMSO), catalposide (0.1-10 µg/mL), LPS (1 µg/mL), or catalposide plus LPS. The cell viability was determined by MTT assay. Each bar represents the mean ± SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. control. **P < 0.05 vs. LPS.

2. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 catalposide가 TNF-α 生成에 미치는 효과

이 實驗에서는 LPS로 刺戟된 RAW 264.7 細胞에서 catalposide가 TNF-α 生成과 mRNA의 發顯에 미치는 影響에 對하여 調査하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 細胞를 LPS로 4 時間 刺戟한 對照群의 TNF-α 生成과 RAW 264.7 細胞에 catalposide로 12 時間 前處理한 後에 LPS로 4 時間 刺戟한 處理群의 TNF-α 生成을 比較調査하였다.

Fig. 2A에 나타난 結果에 의하면, catalposide는 RAW 264.7 細胞의 TNF-α 生成을 效果의으로 阻害시켰다. 또한 RAW 264.7 細胞를 LPS로 12 時間 刺戟한 對照群의 TNF-α mRNA 發顯과 RAW 264.7 細胞에 catalposide로 12 時間 前處理한 後에 LPS로 12 時間 刺戟한 處理群의 TNF-α mRNA의 發顯을 比較調査하였다.

Fig. 2B에 나타난 結果에 의하면, catalposide는 RAW 264.7 細胞의 TNF-α mRNA 發顯을 效果의으로 阻害시켰다.

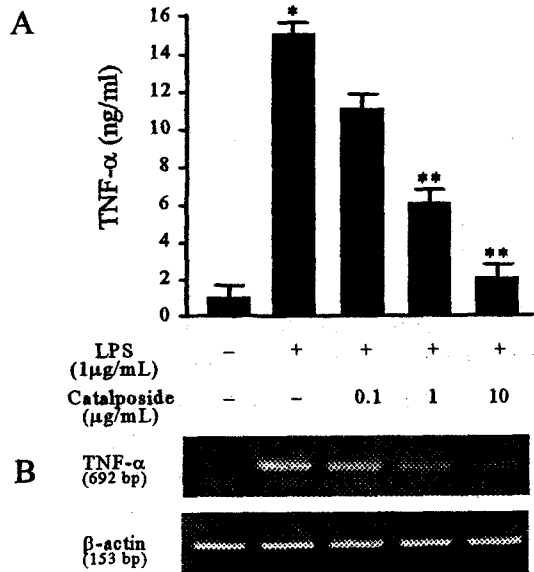


Fig 2. Effects of catalposide on TNF-α secretion (A) and TNF-α gene expression (B) in RAW 264.7 cells. The cells were incubated 4 h (for RT-PCR) or 12 h (for cytokine assay) with medium (containing 0.1% DMSO), LPS (1 µg/mL), or LPS plus catalposide (1 µg/mL). TNF-α concentration was determined by a sandwich immunoassay kit. Each bar

represents the mean \pm SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. control. **P < 0.05 vs. LPS. For the determination of TNF- α gene expression, RT-PCR was carried out as described in Materials and methods. The data shown in panel B are from one representative experiment out of three.

3. LPS로 刺戟된 RAW 264.7 細胞에서 catalposide가 NO 生成에 미치는 效果

이 實驗에서는 LPS로 刺戟된 RAW 264.7 細胞에서 catalposide가 NO 生成과 mRNA의 發顯에 미치는 影響에 對하여 調査하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 細胞를 LPS로 24 時間 刺戟한 對照群의 NO 生成과 RAW 264.7 細胞에 catalposide로 12 時間 前處理한 後에 LPS로 24 時間 刺戟한 處理群의 NO 生成을 比較調査하였다. Fig. 3A에 나타난 結果에 의하면, catalposide는 RAW 264.7 細胞의 NO 生成을 效果的으로 阻害시켰다. 또한 RAW 264.7 細胞를 LPS로 4 時間 刺戟한 對照群의 iNOS mRNA의 發顯과 RAW 264.7 細胞에 catalposide로 12 時間 前處理한 後에 LPS로 4 時間 刺戟한 處理群의 iNOS mRNA 發顯을 比較調査하였다. Fig. 3B에 나타난 結果에 의하면, catalposide는 RAW 264.7 細胞의 iNOS mRNA 發顯을 效果的으로 阻害시켰다.

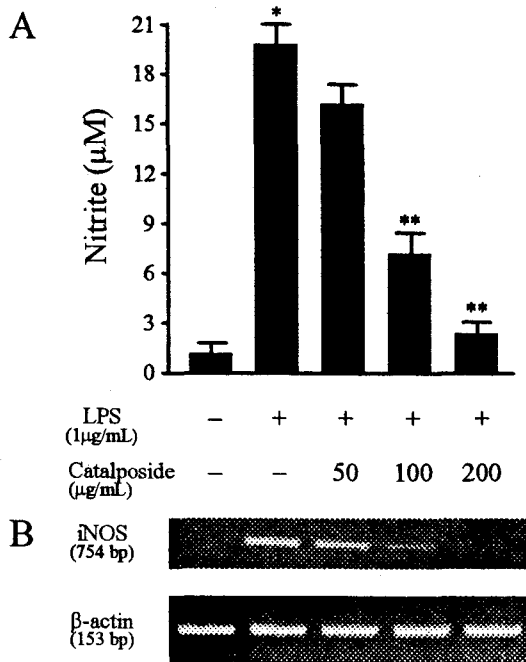


Fig. 3. Effects of catalposide on NO synthesis (A) and iNOS gene expression (B) in RAW 264.7 cells. The cells were incubated 4 h (for RT-PCR) or 12 h (for NO assay) with medium (containing 0.1% DMSO), LPS (1 µg/mL), or LPS plus catalposide (1 µg/mL). NO concentration was determined by Griess reagent. Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. control. **P < 0.05 vs. LPS. For the determination of iNOS gene expression, RT-PCR was carried out as described in Materials and methods. The data shown in panel B are from one representative experiment out of three.

4. Catalposide가 TNF- α 와 iNOS 蛋白質 發顯에 미치는 效果

개오동나무의 樹皮와 果實에서 抽出한 catalposide는 LPS로 刺戟된 RAW 264.7 細胞에서 TNF- α 와 iNOS mRNA의 發顯을 效果的으로 減少시켰다. 그러므로 본 연구에서는 LPS로 刺戟된 RAW 264.7 細胞에서 TNF- α 와 iNOS 蛋白質의 發顯에 미치는 影響에 對하여 調査하였다. 이를 위하여 RAW 264.7 細胞를 LPS로 12 時間 刺戟한 對照群의 TNF- α 와 iNOS 蛋白質의 發顯과 RAW 264.7 細胞에 catalposide로 12 時間 前處理한 後에 LPS로 12 時間 刺戟한 處理群의 TNF- α 와 iNOS 蛋白質 發顯을 比較調査하였다.

그 結果 catalposide는 RAW 264.7 細胞의 TNF- α 와 iNOS 蛋白質 發顯을 濃度 依存的으로 阻害시켰다(Fig. 4).

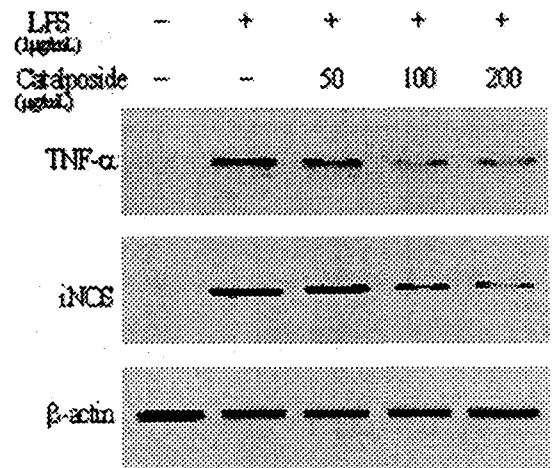


Fig 4. Effects of catalposide on intracellular

TNF- α synthesis and iNOS protein expression in RAW 264.7 cells. The cells were incubated 12 h with medium (containing 0.1% DMSO), LPS (1 μ g/mL), or LPS plus catalposide (1 μ g/mL). For the determination of intracellular TNF- α synthesis and iNOS proteins, Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods. The data shown in panel B are from one representative experiment out of three.

5. Neuro 2A 細胞에서 개오동나무의 MEM이 HO活性에 미치는 효과

이 實驗에서는 먼저 개오동나무의 樹皮와 果實에서 抽出한 媒탄을 抽出物인 MEM이 HO 活性에 미치는 效果를 調査하였다. 이를 위하여 Neuro 2A 細胞를 여러 가지 농도의 MEM으로 24 時間 刺戟하여 HO 活性을 測定하였다. Neuronal heme oxygenase 活性에 대한 MEM 濃度(0 - 200 μ g/mL)에 따른 影響을 Fig. 5에 나타내었다. MEM 처리된 細胞에서 HO-1의 증가된 活性은 對照群 細胞에서의 活性보다 有意性 있는 差異를 보였으며, 200 μ g/mL 濃度에서 최고의 酵素 活性을 나타내었다.

以下 모든 實驗에서 MEM의 濃度는 100 μ g/mL 로 고정하여 수행하였다.

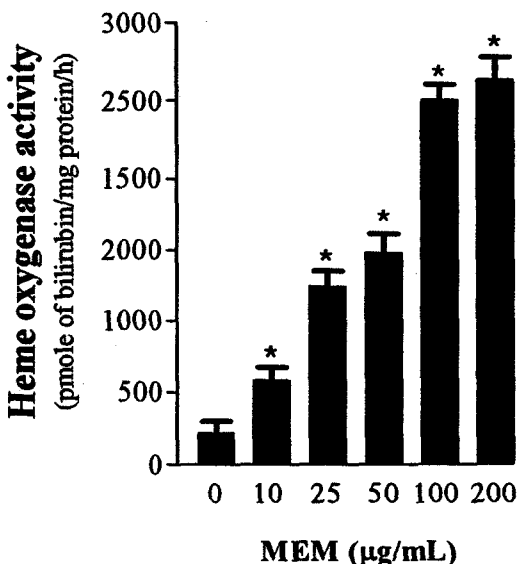


Fig 5. Effect of MEM on heme oxygenase

activity in Neuro 2A cells. Heme oxygenase activity was measured in Neuro 2A cells at 24 h after treatment with various concentrations of MEM. In the control group, cells were incubated with medium alone. These data represent the means \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

6. Neuro 2A 세포에서 MEM이 과산화 수소에 의해 유도된 세포 사멸에 미치는 효과

이 實驗에서는 개오동나무의 樹皮와 果實에서 抽出한 媒탄을 抽出物인 MEM이 過酸化水素에 의해 誘導된 細胞 死滅에 미치는 效果를 調査하였다. 이를 위하여 Neuro 2A 細胞를 過酸化水素 (200 μ M)로 8 時間 刺戟한 對照群과 Neuro 2A 細胞에 다양한 濃度의 MEM을 12 時間 前 處理한 後에 過酸化水素 (200 μ M)로 8 時間 刺戟한 處理群의 細胞 死滅을 比較 調査하였다. 그 結果 MEM (100 μ g/mL)이 過酸化水素로 誘導된 細胞 死滅을 抑制하는 것을 알게 되었다(Table 1).

MEM에 의해 HO 활성이 현저하게 증가하는 농도인 100 μ g/mL에서 對照群과 比較하여 細胞 生存率은 影響을 받지 않았다. 200 μ M 농도의 過酸化水素를 8 時間 동안 細胞에 처리한 結果 細胞 生存率이 對照群에 비하여 69%가 減少하였다(Table 1). 한편, 100 μ g/mL 농도의 MEM을 前 處理한 後에 過酸化水素로 8 時間 刺戟한 處理群의 細胞의 경우 生存率은 過酸化水素만 8 時間 刺戟한 處理群의 細胞에 비해 78%의 生存率을 보였다(Table 1).

Table 1. Effects of MEM on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity.^{a)}

Treatment	Viability (% of control)
Control	100
H ₂ O ₂	31 \pm 3
MEM + H ₂ O ₂	78 \pm 5*
MEM	97 \pm 3

^{a)} Neuro 2A cells were treated with various concentrations of MEM for 12 h and then incubated for 8 h with H₂O₂ (200 μ M). Cell viability was determined by MTT assay. These data represent the means \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. cells treated with H₂O₂ alone.

7. 개오동나무의 MEM에서 純粹 單一 成分의 分離

개오동나무의 樹皮와 果實에서 抽出한 MEM이 Neuro 2A 細胞에서 過酸化水素에 의해 誘導된 細胞 死滅을 抑制할 수 있음을 確認할 수 있었다. 이러한 MEM은 抽出物로 이것에는 여러 單一 成分이 含有되어 있을 것이다.

本 研究는 MEM에서 過酸化水素에 의해 誘導된 細胞 死滅 抑制 效果가 있을 것으로 豫想되는 3 種의 單一 成分을 分離하였다. Fig. 6는 MEM에서 分離된 單一 成分의 化學構造를 表記하였다.

MEM에는 多量의 catalposide가 含有되어 있었다.

8. 過酸化水素로 刺戟된 Neuro 2A 細胞에서 單一 成分이 細胞 死滅에 미치는 效果

개오동나무의 MEM에서 分離된 3 種의 單一 成分의 過酸化水素로 誘導된 細胞 死滅 抑制 效果를 먼저 調査하였다. 이를 위하여 Neuro 2A 細胞를 過酸化水素 (200 μM)로 8 時間 刺戟한 對照群과 Neuro 2A 細胞에 5 種의 成分을 각각 12 時間 前處理한 後에 過酸化

水素 (200 μM)로 8 時間 刺戟한 處理群의 細胞 死滅을 比較調査하였다.

Table 2에서는 3 種의 成分 중에서 catalposide가 가장 效果의으로 過酸化水素로 誘導된 細胞 死滅을 抑制시켰다.

Table 2. Effects of three compounds isolated from MEM on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity.^{a)}

Treatment	Viability (% of control)
Medium	100
H2O2	33 ± 3
+ catalposide	77 ± 4
+ aglycon of catalposide	37 ± 4*
+ specioside	46 ± 5

^{a)} Neuro 2A cells were pre-treated for 12 h with each compound at 1 μg/mL and then incubated for 8 h with H₂O₂ (200 μM). Cell viability was determined by MTT assay. *p < 0.05 vs. cells treated with H₂O₂ alone.

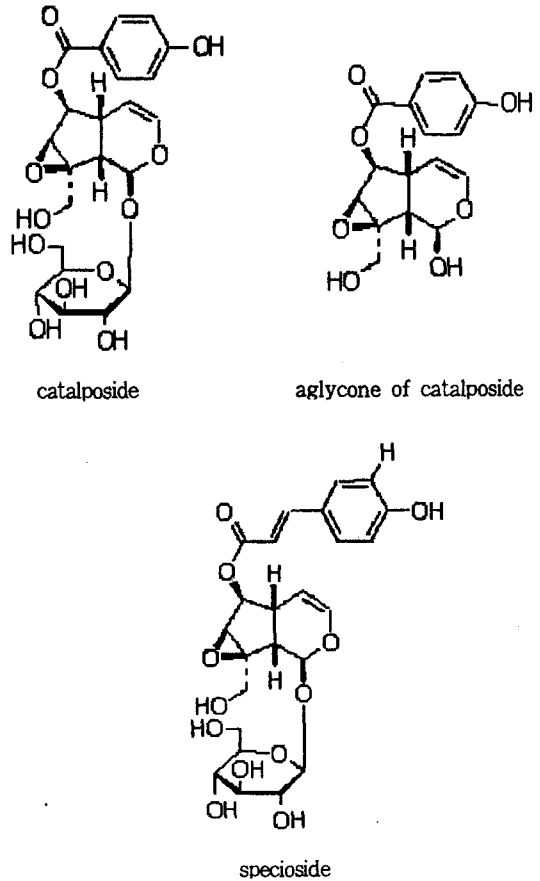


Fig. 6. Chemical structures isolated from MEM. Three molecules were isolated by using HPLC, and their chemical structures were confirmed by using H¹ and C¹³ NMR spectra together with mass spectra.

9. 過酸化水素로 刺戟된 Neuro 2A 細胞에서 單一 成分이 HO 活性에 미치는 效果

개오동나무의 MEM에서 分離된 3 種의 單一 成分의 HO 活性 效果를 먼저 調査하였다. 이를 위하여 Neuro 2A 細胞에 3 種의 成分을 각각 24 時間 處理한 後에 HO 活性을 比較 調査하였다.

Table 3에서는 3 種의 成分 중에서 catalposide가 가장 效果的으로 HO 활성을 나타내었다.

Table 3. Effects of catalposide, aglycone of catalposide, and specioside on HO activity in Neuro 2A cells.^{a)}

Treatment	HO activity (pmol of bilirubin/ mg protein/h)
Medium	317 ± 58
Catalposide	2146 ± 99*
Aglycon of catalposide	498 ± 54
Specioside	539 ± 76

^{a)} Neuro 2A cells were exposed to 1 µg/mL of catalposide, aglycone of catalposide and specioside and HO activity was measured at 24 h as described in Materials and methods. These data represents the means ± SD of three independent experiments. *p < 0.05 vs. medium.

10. HO-1 蛋白質 發顯과 HO酵素 활성에 대한 catalposide 濃度の 效果

HO-1 蛋白質 發顯에 대한 catalposide의 影響을 調査하기 위하여 여러 가지 濃度の catalposide를 24 時間 동안 Neuro 2A 細胞에 處理하였다. Neuronal HO activity와 HO-1 蛋白質 發顯에 대한 catalposide 濃度 (0-50 µg/mL)에 따른 影響을 Fig. 7A와 B에 나타내었다. Western blot 分析으로부터 catalposide에 의한 HO-1의 濃度 依存的 誘發을 確認할 수 있었다 (Fig. 7A). 또한, catalposide를 24 時間 동안 Neuro 2A 細胞에 露出시킴으로서 HO 活性이 濃度 依存的으로 增加함을 觀察할 수 있었다 (Fig. 7B). Catalposide 처리된 細胞에서 HO-1의 增加된 活性은 對照群 細胞에서의 活性보다 有意性 있는 差異를 보였으며, 1 µg/mL 濃度以上에서 最高의 酵素 活性을 나타내었다. Western blot 分析에서 catalposide에 의해 向上된 HO 活性은 HO-1 蛋白質 水準과 直接的인 關聯이 있음을 나타내었다 (Fig. 7A, B). 1 µg/mL 濃度の catalposide에서 최대의 HO-1 發顯을 誘導하였다. 以下 모든 實驗에서 catalposide의 濃度は 1 µg/mL로 고정하여 수행하였다.

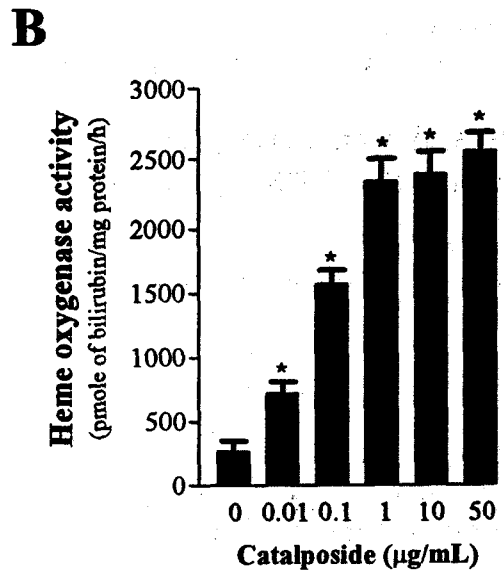
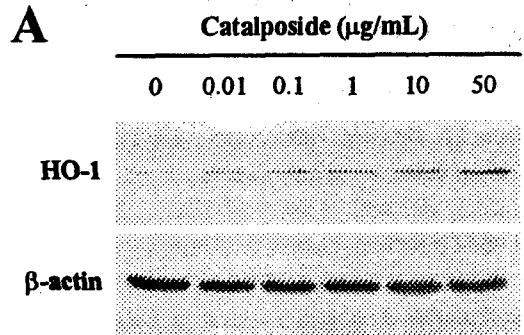


Fig. 7. Effect of catalposide on HO activity and HO-1 expression in Neuro 2A cells. (A) HO-1 protein expression was analyzed by Western blot analysis as described in Materials and methods. (B) HO activity was measured in Neuro 2A cells at 24 h after treatment with various concentrations of catalposide. In the control group, cells were incubated with medium alone. Each bar represents the mean ± SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. control.

11. HO-1 遺傳子 및 蛋白質 發顯과 HO 酵素 활성에 대한 catalposide 處理 時間의 效果

Fig. 8A에서 보는 것과 같이 Neuro 2A 細胞에서 catalposide에 의한 HO-1 蛋白質 發顯은 時間 依存的으로 增加하였다. Catalposide (1 µg/mL)를 處理後 6 時間이 經過한 다음에 HO-1 蛋白質의 發顯이 나타나기 始作하였으며, 24 時間 정도에서 最高에 到達하였다. 이

러한 효과는 Fig. 8B의 HO 활성 분석에서 보여주는 것과 같이 시간 의존적으로 활성이 증가하는 것과 일치하였다.

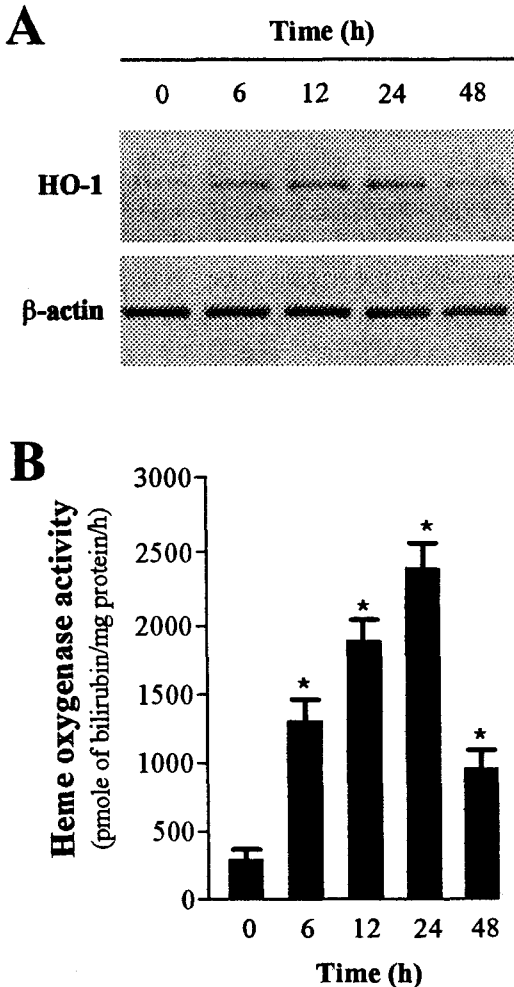


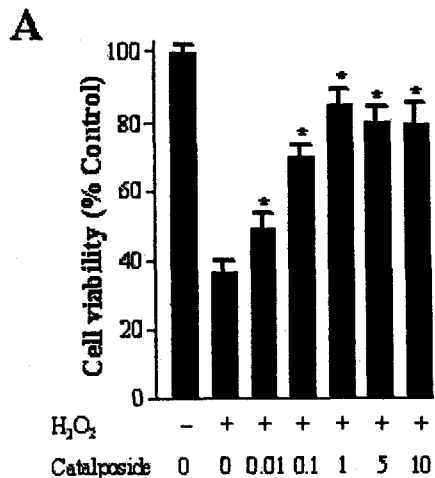
Fig. 8. Time course of HO-1 protein expression and HO activity in Neuro 2A cells exposed to catalposide. HO-1 protein expression (A) and HO activity (B) were measured in Neuro 2A cells at various time points as described in Materials and methods. In the control group, cells were incubated with medium alone. Western blot analysis was performed using specific antibodies for HO-1 and β -actin. Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. control.

12. 과산화수소에 의해誘導된 neurotoxicity에 대한 catalposide의 효과

이 실험에서는 과산화수소로誘導된 세포損傷에 대한 catalposide의防禦效果를調査하여 본結果 catalposide가濃度依存的으로 과산화수소로誘導된 세포死滅을抑制하는 것을 알게 되었다(Fig. 9A). 다양한濃度の catalposide를 12時間前處理한 다음 과산화수소를 8時間處理한後에 Neuro 2A細胞의生存率을測定하였다. Catalposide에 의해 HO 활성이 현저하게增加하는濃度인 0.01-10 μ g/mL 범위에서對照群細胞와比較하여細胞生存率은影響을 받지 않았다. 200 μ M濃度の 과산화수소를 8時間 동안細胞에處理한結果細胞生存率이對照群細胞에 비하여 62%가減少하였다(Fig. 9A, B). 한편, 1 μ g/mL 농도의 catalposide로前處理한後 과산화수소에露出된細胞의 경우生存率은 과산화수소만處理한細胞에比較하여 84%의生存率을 보였다(Fig. 9A, B). 또한 특이적 HO抑制製인 ZnPP IX을 이용하여 catalposide의抗酸化活性에서 HO-1의關聯性を再確認하였다. 이 때에 과산화수소로 유도된細胞死滅에 대한 catalposide의抑制效果가 10 μ M濃度の ZnPP IX에 의해 두드러지게阻害되는 것을觀察할 수 있었다(Fig. 9B).

또한 catalposide (1 μ g/mL)에 의한 HO 활성의 증가는 HO抑制製인 ZnPP IX에 의해抑制됨을確認하였다(Fig. 9C).

이러한結果는 catalposide의抗酸化效果가 HO-1의誘發에 의해 나타나는 것임을分明하게視事하는 것이다.



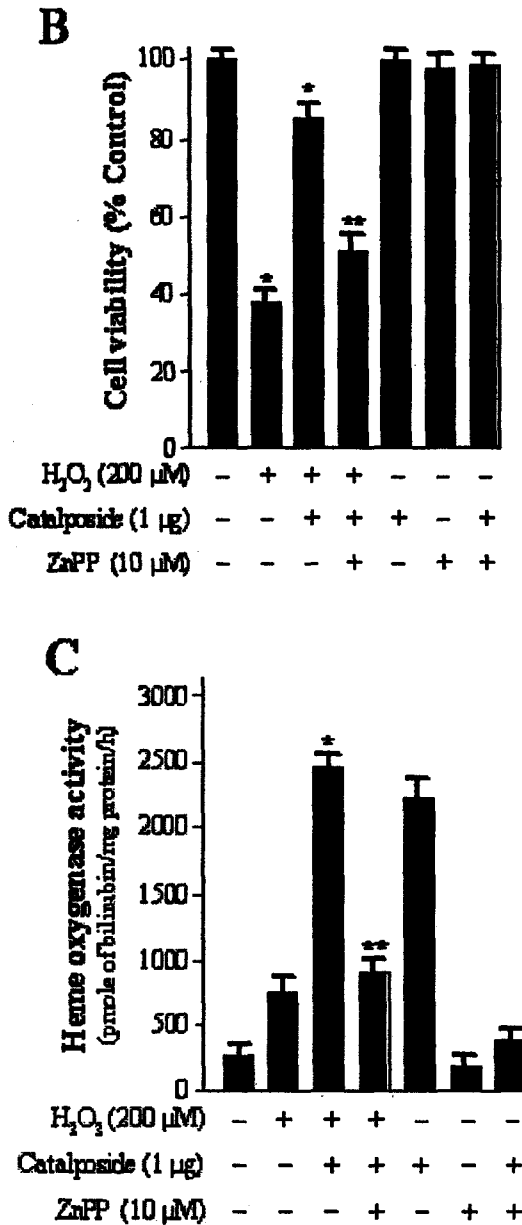


Fig. 9. Neuroprotective effect of catalposide against hydrogen peroxide-induced cell death. (A) Neuro 2A cells were pretreated with various concentrations of catalposide (0.1-1 μg/mL) and then incubated for 8h with H₂O₂ (200 μM). (B) and (C) Cells were treated with 1μg/mL of catalposide for 12h in the presence or absence of 10μM ZnPP IX. After this pretreatment, cells were incubated for 8h with H₂O₂ (200μM). (B) After these treatments, cells were washed and viability was assessed using the MTT

assay. (C) HO activity determined via measuring bilirubin formation as described in Materials and methods. These data represents the means ± SD of three independent experiments. *P < 0.05 vs. H₂O₂; **P < 0.05 vs. H₂O₂ plus catalposide

고찰

개오동나무(*Catalpa ovata* G. Don.)¹⁻³⁾는 능소화과(紫葳科; Bignoniaceae)에 속한 落葉喬木으로서 本草學文獻의 最古 原典인 《神農本草經》¹³⁾에 “梓白皮”라고 記錄된 것이 嚆矢이며, 그 뒤 “梓白皮”^{3,5,7,10-11,14)}, “梓根白皮”⁶⁾, “梓木”^{3,5,7,10-11)}, “梓葉”^{3,5,10-11,14)} 및 “梓實”^{7-12,15)}로 응용되었다.

그 동안 밝혀진 成分으로는 樹皮에는 catalposide¹¹⁾, ρ-hydroxybenzoic acid³⁾, 2-(4-hydroxyphenyl) ethyl triaccontanoate¹¹⁾, 9-methoxy-α-lapachone¹¹⁾, ferulic acid¹¹⁾, 6-feruloyl catapo¹¹⁾, 6-feruloyl sucrose¹¹⁾, α-lapachone¹¹⁾, 9-hydroxy α-lapachone¹¹⁾, ρ-coumaric acid¹¹⁾를 含有하고; 根皮에는 isoferulic acid^{3,11)}, sitosterol^{3,11)}, ρ-hydroxybenzoic acid^{3,11)}를 含有 하며; 木質에는 catalpalactone^{3,11)}, β-sitosterol¹¹⁾, cerotic acid¹¹⁾, vanillic acid¹¹⁾, ferulic acid¹¹⁾, ρ-hydroxybenzoic acid¹¹⁾, ρ-hydroxycinnamic acid¹¹⁾, syringic acid¹¹⁾, vanilline¹¹⁾, glucose¹¹⁾, mannose¹¹⁾, xylose¹¹⁾, rhamnose¹¹⁾, 2-(4-hydroxy phenyl) ethyl triaccontanoate¹¹⁾, 1-octacosanoyl glyceride¹¹⁾, tetracosanoic acid¹¹⁾, n-hexacosyl ferulate¹¹⁾, catalponone¹¹⁾, deoxylapachol¹⁾, catalponol¹¹⁾, 1-menaquinone¹¹⁾, α-lapachone¹¹⁾, 4-hydroxy-α-lapachone¹¹⁾, 9-hydroxy-α-lapachone¹¹⁾, 4,9-hydroxy-α-lapachone¹¹⁾, 8-hydroxydehydro-iso-α-lapachone¹¹⁾, 1-hydroxy-2-methyl-anthraquinone¹¹⁾, dehydro-α-lapachone¹¹⁾을 含有하고; 葉에는 ρ-coumaric acid³⁾와 ρ-hydroxybenzoic acid³⁾를 含有하며; 果實에는 catalposide^{3,11)}, catalpinoside¹¹⁾, catalpol¹¹⁾, des-ρ-hydroxybenzoil -catalposide³⁾, ρ-hydroxybenzoic acid^{3,11)}, citric acid^{3,11)}를 含有하고; 또 種子에는 ρ-hydroxybenzoic acid³⁾, β-sitosterol³⁾ 등을 含有한다.

藥理作用으로는 葉의 冷浸液, 溫浸液은 黃色葡萄球菌, 大腸菌, aerogenes에 대한 抑制作用이 있으며^{3,10)}, 果實의 경우 水溶性 抽出物 및 果皮, 種子의 抽出物은 Rat와 家兔에 대해서 利尿作用을 갖는 동시에 電解質의 排出을 增加시키고 아울러 果實에서 利

尿作用을 갖는 配糖體가 抽出되고 있으며 Rat의 利尿實驗에서는 des-p-hydroxybenzoil-catalposide의 作用은 catalposide보다도 強하며 前者는 主로 natrium, 後者는 chlorine ion 利尿作用이 있다^{3,10}.

개오동나무의 樹皮와 果實은 韓醫學 臨床에서 炎症性 疾患에 應用되어 왔으나 實驗의 抗炎症效果 및 細胞枯死 抑制效果에 대한 報告는 接하지 못하였으므로 著者는 catalposide를 抽出, 分離한 뒤 이들이 抗炎症效果 및 抗酸化效果에 어떠한 影響을 미치는지 그 機轉과 細胞枯死 抑制效果의 生理活性을 檢索하고 이러한 作用에 대한 生化學的 機轉을 調査하였다.

腫瘍을 비롯한 大部分의 疾患이 炎症性 疾患이라고 하여도 過言이 아니다. 現在 使用되고 있는 非 steroid 抗炎症劑의 大部分은 抗炎症作用 이외에도 胃腸障礙 등의 各種 副作用을 일으켜 長期間의 服用이 어려운 問題를 안고 있다. 그러므로 著者는 藥用植物인 개오동나무의 樹皮와 果實에서 抽出한 catalposide의 抗炎症效果 및 作用機轉을 糾明하고자 LPS로 刺戟된 RAW 264.7 細胞에서 TNF- α 와 NO의 生成에 미치는 效果에 對하여 調査하였다.

그 結果 개오동나무의 樹皮와 果實에서 抽出한 catalposide는 LPS로 刺戟된 RAW 264.7 細胞에서 重要한 炎症媒介體인 TNF- α 와 NO의 生成을 抑制함을 볼 수 있었다.

大食細胞에서 TNF- α 와 NO 生成의 抑制는 遺傳情報의 傳寫와 翻譯 調節한다고 알려졌다¹⁶. 마찬가지로 catalposide에 의한 TNF- α 와 NO의 生成 抑制도 遺傳情報의 傳寫抑制, mRNA의 半減期 減少, 遺傳情報의 翻譯抑制에 의해서 일어난다.

結果의으로 catalposide는 TNF- α 와 iNOS 遺傳子의 發顯을 妨害하여 TNF- α 와 NO의 生成과 蛋白質 發顯을 抑制함을 알 수 있었다.

文獻에 알려진 바와 같이, 治療效果를 가지는 많은 藥用植物은 iridoid 構成物로 이루어져 있다¹⁷. 실제로, 特定 iridoid 生成植物은 抗炎症劑로 使用되기도 하였다¹⁷.

개오동나무도 iridoid 生成植物¹⁸ 중 하나이며, 오랫동안 韓醫學에서 抗炎症을 目的으로 사용되어 왔으며, iridoid 構成物은 catalposide, specioside, catalpol로 알려졌다¹⁸. 그러나 이 構成物들이 大食細胞에서 TNF- α 와 NO의 生成을 抑制하는지는 알려지지 않았다.

따라서 이 實驗에서 立證한 개오동나무의 構成成分 가운데서 catalposide가 大食細胞에서 TNF- α 와 NO의 生成을 抑制한다는 結果는 개오동나무의 抗炎症 效果를 體系의으로 立證한 것으로 示唆하는 것이라고 생각한다.

抗炎症效果에 대하여 검토한 것을 要約하면 개오동나무

에서 抽出한 catalposide는 LPS 刺戟에 의한 大食細胞의 TNF- α 와 NO 生成을 抑制하며, 이러한 抑制效果는 遺傳情報의 傳寫妨害에 의해 일어난다고 할 수 있다.

또한 이 實驗에서 개오동나무의 抽出物인 catalposide가 神經細胞의 HO-1 遺傳子 및 蛋白質 發顯과 heme oxygenase 活性을 濃度와 時間 依存的으로 上向 調節한다는 것을 볼 수 있었다.

Catalposide를 細胞에 處理하였을 경우 酸化劑로 媒介된 細胞 損傷에 대한 높은 抵抗性을 나타내는 것을 發見하였으며, 이때에 HO-1 經路의 誘發이 觀察된 細胞防禦의 原因이 되는 것으로 생각된다.

한편, 이러한 抗酸化 役割에 있어서 catalposide가 blood brain barrier를 通過하는지 또한 腦에서 組織에 濃縮되는지는 아직 分明하게 밝혀지지 않았다. 그리고 動物實驗에서 이 抽出物이 神經退行性 疾患에 陽性的인 效果를 갖는지는 아직 遂行해야 할 課題로 남아있다.

最近 몇 년동안 여러 가지 藥理學的 및 生物學的 活性의 上昇에 대한 catalposide의 效能에 活潑한 研究가 進行 中에 있다¹⁹⁻²⁰.

Catalposide는 酸化性 DNA 損傷을 抑制하는 效果를 가지고 있으며, hydroxyl radical과 superoxide와 같은 酸素 radical을 除去하는 活性을 가지고 있음이 알려졌다²⁰.

이 實驗에서는 catalposide의 抗酸化 特性이 여러 가지 stress성 刺戟에 대한 防禦效果와 關聯된 heat shock protein인 HO-1의 發顯을 誘導할 수 있는지를 밝히고자 하였는데 실제로 catalposide는 0.1-10 μ g/mL 濃度の 範圍에서 神經細胞의 HO-1 發顯을 현저하게 增加시켰다.

細胞 生存率에 대한 catalposide의 效果를 알아보기 위해 遂行된 實驗에서 1 μ g/mL의 catalposide로 培養하였을 경우에 細胞 損傷이 현저하게 減少됨을 觀察하였다. catalposide를 12時間 동안 處理한 경우 酸化的 損傷에 대한 向上된 抵抗性을 보였으며, catalposide에 의해 나타나는 細胞 保存性이 heme oxygenase 활성 抑制劑인 ZnPP IX에 의해 抑制되는 것과 같이 이러한 酸化的 損傷에 대한 細胞 保存效果는 HO-1의 誘發에 起因한다고 생각된다.

여러 가지 病理學的 條件들이 酸化性 stress와 關聯되어 있기 때문에 抗酸化的 治療 方法의 開發이 매우 重要하다. 따라서 이러한 抗酸化 活性에 根據하여 catalposide는 酸化的 stress가 關聯되어 있는 慢性 進行性 疾患과 같은 病變에 臨床的으로 利用될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

개오동나무의 樹皮와 果實에서 Catalposide를 抽出, 分離한 뒤에 이들이 抗炎效果和 抗炎 機轉 및 catalposide의 過酸化水素로 誘導된 細胞枯死 效果和 細胞枯死 抑制 機轉에 대하여 實驗的으로 研究한 結果 다음과 같이 要約할 수 있었다.

1. catalposide는 炎症誘發物質 LPS 刺戟에 의한 RAW 264.7 細胞의 TNF- α 및 NO의 生成을 抑制시켰다.
2. catalposide는 炎症誘發物質 LPS 刺戟에 의한 RAW 264.7 細胞의 TNF- α 및 NO의 발현을 抑制시켰다.
3. 개오동나무의 methanol 抽出物 MEM은 Neuro 2A 細胞에서 heme oxygenase 活性을 誘導하며, 過酸化水素에 의해 誘導된 細胞枯死를 抑制하였다.
4. Neuro 2A 細胞에서 catalposide는 濃度와 時間 依存的으로 HO-1 mRNA 및 蛋白質 發顯과 heme oxygenase 活性을 增加시켰다.
5. Catalposide를 Neuro 2A 細胞에 前 處理 하였을 경우 過酸化水素로 誘導된 細胞枯死에 대한 抑制效果를 보였다.
6. Catalposide에 의한 細胞枯死 抑制效果는 heme oxygenase 抑制劑인 zinc protoporphyrin IX에 의해 逆轉되었다.

以上の 結果로 미루어 개오동나무의 樹皮와 果實 등의 抗炎效果는 有效成分인 catalposide가 TNF- α 및 NO의 發顯과 生成의 抑制와 關聯이 있는 것으로 理解되며 또한 細胞枯死 抑制效果에 있어서는 有效成分인 catalposide가 HO-1 遺傳子 發顯을 誘導함으로써 酸化性 stress로부터 神經細胞를 保護할 수 있음을 示唆하고 있다.

그러므로 이러한 抗氧化 活性에 根據하여 catalposide가 含有된 개오동나무의 樹皮와 果實 등은 酸化的 stress가 關聯되어 있는 慢性 退行性 疾患과 같은 病變에 韓醫學 臨床등에 應用될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교 교비에 의하여 수행 되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 鄭台鉉. 韓國動植物圖鑑. 서울:文教部. 1965:1050.
2. 李昌福. 大韓植物圖鑑. 서울:鄭文社. 1980:686.
3. 牧野富太郎. 牧野 新日本植物圖鑑. 일본: 北陵館. 1988:569.
4. 辛民教, 鄭普燮. 圖解 藥藥(生藥)大事典. 서울:圖書出版 永林社. 1990:871-872.
5. 朱有昌. 東北藥用植物. 哈爾濱:黑龍江科學技術出版社. 1989:1041-1042.
6. 四川中藥志. 四川中藥志(一). 四川:四川人民出版社. 1979:269-270.
7. 李萬林. 中國長白山藥用植物彩色圖志. 北京:人民衛生出版社. 1997:382-383.
8. 全國中草藥匯編. 全國中草藥匯編. 四川:人民衛生出版社. 1978:539-540.
9. 湖北省衛生局. 湖北中草藥志(二). 湖北:湖北人民出版社. 1982:850-853.
10. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社. 1977:1988-1989.
11. 中華本草. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1999:7, 422-425.
12. 吉林省中醫中藥研究所. 長白山植物藥志. 吉林:吉林人民出版社. 1982:1033-1036.
13. 濟, 孫星衍. 神農本草經. 卷三. 臺北:聞名學社出版社. 1985:23.
14. 陳寅廷. 本草綱目通釋. 北京:學苑出版社. 1992:1637-1638.
15. 王本樣. 現代中藥藥理學. 天津:天津科學技術出版社. 1997:594-596.
16. Park E, Schuller-Levis G and Quinn M.R. Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells by mechanisms that involve transcriptional and translational events. *J. Immunol.* 1995;154:4778-4784.
17. Recio M.C, Giner R.M, Manez S, and Rios J.L. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med.* 1994;60: 232-234.
18. Chiang L.C, Ng L.T, Chiang W, Chang. M.Y and Lin, C.C. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago*

- species. *Planta Med.* 2003;69:600-604.
19. Morita T, Perrella M.A, Lee M.E and Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92:1475-1479.
20. Christodoulides N, Durante W, Kroll M.H and Schafer A.I. Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation.* 1995;91:2306-2309.