

## 葫蘆巴추출물의 Peroxynitrite 제거 및 염증 인자 단백질 억제 효과

이철호, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

---

### Effect of *Trigonellae Semen* on Peroxynitrite Scavenging Activity and Protein Expression of Proinflammatory Mediators

Cheol-Ho Lee, Ji-Cheon Jeong

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives :** Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>),  $\cdot O_2^-$  and nitric oxide (NO) are cytotoxic species that can oxidize several cellular components such as proteins, lipids and DNA. It has been implicated in the aging process and age-related disease such as Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, cancer and atherosclerosis. The aim of this study was to investigate ONOO<sup>-</sup> scavenging activities, and that of its precursors, NO and  $\cdot O_2^-$  of *Trigonellae Semen*.

**Methods :** To investigate ONOO<sup>-</sup>, NO,  $\cdot O_2^-$  scavenging activities, fluorescent probes, namely 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) and dihydrorhodamine 123 (DHR 123) were used. Protein expression levels of iNOS, COX-2, NF- $\kappa$ B, and VCAM-1 were assayed by western blot.

**Results :** *Trigonellae Semen* markedly scavenged authentic ONOO<sup>-</sup>,  $\cdot O_2^-$  and NO. It also inhibited ONOO<sup>-</sup> induced by  $\cdot O_2^-$  and NO which are derived from SIN-1. Furthermore, *Trigonellae Semen* inhibited ONOO<sup>-</sup>,  $\cdot O_2^-$  and NO generation in LPS-treated ICR mouse kidney postmitochondria. *Trigonellae Semen* inhibited gene expression of iNOS, COX-2, VCAM-1 and NF- $\kappa$ B (p65) activation.

**Conclusions :** These results suggest that *Trigonellae Semen* is an effective ONOO<sup>-</sup>,  $\cdot O_2^-$  and NO scavenger, and that this substance has a potential role as an inhibitor of the aging process, and in therapy against age-related diseases.

**Key words:** *Trigonellae Semen*, peroxynitrite, nitric oxide, reactive oxygen species, iNOS, COX-2, VCAM-1, NF- $\kappa$ B

---

### 1. 서론

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 활

성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)에 의한 oxidative stress가 노화 및 노인성 질환의 발생 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>1,2</sup>. NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있으며, 특히  $\cdot O_2^-$ 와 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)를 생성한다<sup>3</sup>. 산화 스트레스 가설에 의하면 활성질소·산소가

---

· 교신저자: 정지천 경북 경주시 석장동 1090-1  
동국대학교 경주한방병원 2내과  
Tel:(054)770-1285 fax:054-770-1500  
E-mail : jicjh@paran.com

세포 및 조직 손상을 초래하여 노화 과정을 촉진한다고 하였으며<sup>1</sup>, 노화의 염증 가설에 의하면 이때 생성되는 ONOO<sup>-</sup>가 노화의 주범이라고 하였다<sup>4</sup>. ONOO<sup>-</sup>는 NO와  $\cdot O_2^-$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 당뇨병, 심근장해, 패혈증, 고혈압, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다<sup>3-7</sup>.

노화 과정의 주요한 원인으로 reactive species (RS) 뿐만 아니라 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), xanthine oxidase (XOD), NADPH oxidase와 같은 활성종을 생성하는 효소들이 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>8</sup>. COX-2는 노화 과정에서 현저히 발현이 증가하고 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 노화 지표이며<sup>8</sup>, iNOS는 각종 cytokine과 bacteria 산물인 endotoxin 및 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의하여 전사단계에서 발현이 증가된다<sup>9</sup>. 또한 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)은 활성산소에 의한 산화스트레스를 받으면 혈관내피세포에서 발현하는 접착분자로서 동맥경화를 유발한다<sup>7</sup>. 특히 여러 가지 자극에 의해 반응되는 것으로 알려진 redox (산화환원) 감수성 인자 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)는 inhibitor  $\kappa$ B (IkB)라 불리는 저해성 분자에 의해 불활성 상태로 세포질에 존재한다. NF- $\kappa$ B는 p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (Rel-A), c-Rel 등이 결합한 형태로 존재하는데 주로 p65-p50 heterodimer의 NF- $\kappa$ B가 주로 관찰된다<sup>10</sup>. NF- $\kappa$ B는 유전자 발현을 통해 apoptosis, 종양 형성, 세포 증식, 염증, 면역 반응을 조절하는데<sup>11</sup>, COX-2와 iNOS 및 VCAM-1 등은 NF- $\kappa$ B에 의해 유전자 발현이 조절된다.

葫蘆巴 (*Trigonellae Semen*)는 콩과에 속하는 호로파의 씨로서 補腎陽 暖丹田 逐寒濕 등의 효능으로 陽痿, 滑泄, 疝氣 등에 활용되고 있다<sup>12-14</sup>. 특히 腎臟虛冷하여 陽氣不能歸元하는 병증을 치료하는 右腎命門藥으로 작용하는데<sup>13,14</sup> 腎虛는 한의학에서 노화의 주된 원인이므로<sup>15</sup>, 노화 억제 효과를 나타

낼 것으로 기대된다.

본 연구에서는 葫蘆巴의 노화 억제 효능을 검토하기 위한 일환으로 ONOO<sup>-</sup> 및 그 전구체인 NO와  $\cdot O_2^-$ 에 대하여 제거능이 있는지를 조사하고 LPS에 의해 유도한 염증성 단백질의 발현에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

葫蘆巴 (*Trigonellae Semen*)를 시중 (태원당약업사, 대구, 한국)에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

#### 2) 시약

Sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad (Hercules, USA), NP-40, CAPS, protease inhibitors, 3-Morpholinopyrrolidine (MOP), DL-penicillamine, sodium nitroprusside(III) dihydrate (SNP), lipopolysaccharides (LPS), bovine serum albumine, thiobarbituric acid(TBA), sulfosalicylic acid, potassium phosphate는 Sigma chemical Co. (ST. Louis, MO, USA), dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA), ONOO<sup>-</sup>, carboxy-PTIO sodium salt는 Calbiochem (A Brand of EMD Biosciences, Inc., USA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan), 1차 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)에서 구입하였고, sodium chloride, hydrogen peroxide, ethanol, methanol 및 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다.

#### 3) 동물

생후 6주령된 체중 25g 내외의 외관상 건강한

ICR mouse (오리엔트, 대구, 한국)를 Light dark cycle 12h, 온도 25°C, 습도 60% 유지되는 조건에서 적응 사육하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 葫蘆巴 200 g에 3배량의 95% methanol을 가하고 60°C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 18.2 g (수율 9.1%)을 얻어 실험에 사용하였다.

### 2) ONOO<sup>-</sup> 측정법

Kooy 등의 방법<sup>16</sup>에 의해 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 葫蘆巴추출물을 2, 10, 50 µg/ml 농도별로 분주하고, 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 µM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 µM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)를 가한다. 그리고 10 µM ONOO<sup>-</sup>를 첨가한 후, 형광 광도를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 측정하였다. ONOO<sup>-</sup> 생성원으로는 시판 ONOO<sup>-</sup> 와 SIN-1을 처리하여 생성되는 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>와 NO에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 검토하였다.

### 3) 활성산소 측정법

DCFDA assay<sup>17</sup>로 활성산소를 측정하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20°C에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 µM DCFDA와 6 U/esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 37°C에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관하였다. 96 well microplate에 葫蘆巴추출

물을 2, 10, 50 µg/ml 농도별로 분주하고, 활성산소 생성원과 DCFDA를 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 5분 간격으로 7회 측정하였다. 이때 활성산소 생성원으로 SIN-1을 사용하였다.

### 4) NO 측정법

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 생성하며 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. Dimethyl sulfoxide 550 µl에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석하여 사용하였다. 96 well microplate에 葫蘆巴추출물을 2, 10, 50 µg/ml 농도별로 분주하고, NO 생성원과 DAF-2를 첨가한 후 형광 광도계를 이용하여 여기파장 485 nm와 방출파장 535 nm에서 3분 간격으로 7회 측정하였다. 이때 NO 생성원으로 SNP를 사용하였다<sup>18</sup>.

### 5) LPS 처리 마우스 신장 균질액에서 ONOO<sup>-</sup>, NO 및 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> 억제 활성 측정

마우스에 LPS (5 mg/kg)를 5시간 처리하여 활성산소·질소 생성체를 유도한 후에 신장을 적출하여 그 postmitochondria 분획과 葫蘆巴추출물을 96 well microplate에 분주한 후 DCFDA를 처리하고 형광광도계 (여기파장 490 nm / 방출파장 520 nm)로 형광을 측정하여 활성산소 생성체에 미치는 영향을 검토하였다<sup>17</sup>. 또한 DHR 123을 처리한 후 여기파장 500 nm / 방출파장 536 nm에서 형광을 측정하여 ONOO<sup>-</sup> 제거능<sup>16</sup>, DAF-2를 처리하여 여기파장 485 nm / 방출파장 530 nm에서 NO 제거능<sup>18</sup> 평가하였다.

### 6) 동물의 처치

실험 동물을 정상군, LPS를 처리한 대조군 및 葫蘆巴추출물을 투여하고 LPS를 처리한 실험군으로 분류하였으며, 각 군에 5마리씩 배정하였다. 葫蘆巴추출물은 10, 20, 50 mg/kg의 용량을 1일 1회 5일간

경구투여하였고, 대조군에는 동량의 증류수를 투여하였다. 6일째 LPS 5 mg/kg을 복강주사하고 5시간 후 ether로 가볍게 흡입 마취시킨 상태에서 복부 정중선을 따라 개복하고 신장을 적출하여 균질화한 후, cytosol, nuclear 분획을 실험에 사용하였다.

### 7) Western blot analysis

마우스에서 적출한 신장 조직 균질액의 cytosol, nuclear 분획에서 단백질을 분리하여 염증인자의 단백질 발현을 관찰하였다. 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켜 주었다. 이 membrane을 분리한 후 5% skim milk로 단백질이 결합하지 않은 부분의 비특이적 antibody 결합을 차단시키고 각 타겟 단백질의 1차 antibody를 2시간 이상 처리하였다. 이 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 TBST로 60분간 세척한 다음 2차 antibody를 2시간 이상 반응시키고, TBST로 60분간 세척한 다음 membrane에 ECL solution을 반응시켜 발생된 형광을 X-ray film에 감광시켰다.

### 8) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법<sup>19</sup>과 Bradford protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

### 9) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's *t*-test를 이용하여 통계 처리하였다.

## III. 成 績

### 1. ONOO<sup>-</sup> 제거 활성

葫蘆巴추출물이 ONOO<sup>-</sup>에 대하여 직접 제거 활성을 나타내는지를 검토한 결과 2, 10, 50 μg/ml 농도에서 각각 11, 54, 79%의 제거 활성을 나타내었

다. ONOO<sup>-</sup> 제거제로 잘 알려져 있는 penicillamine 보다 약하지만 비교적 강한 ONOO<sup>-</sup> 제거 활성을 나타내었다 (Fig. 1).

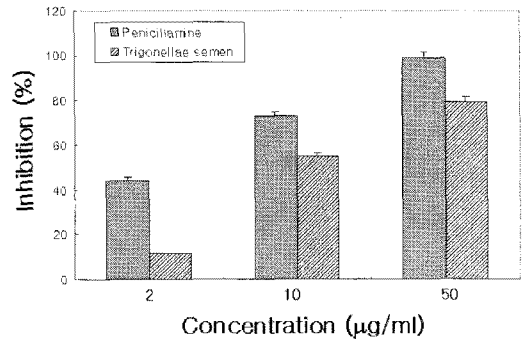


Fig. 1. Inhibition of ONOO<sup>-</sup> generation by *Trigonellae Semen*. *Trigonellae semen* (2, 10, 50 μg/ml) and ONOO<sup>-</sup> were added to each well. The generation of reactive species was measured by DHR 123 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.D.

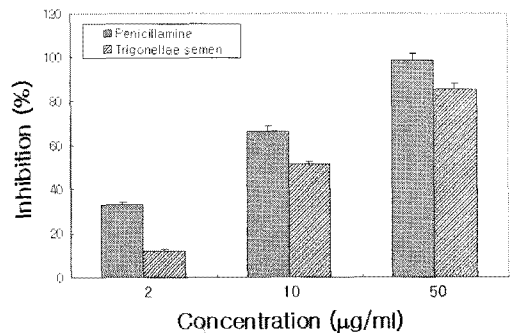


Fig. 2. Effect of *Trigonellae Semen* on SIN-1-induced ONOO<sup>-</sup> generation. *Trigonellae Semen* (2, 10, 50 μg/ml) and SIN-1 were added to each well. The generation of reactive species was measured by DHR 123 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.D.

2. SIN-1에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup> 억제 활성

葫蘆巴추출물의 SIN-1에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup>에 대한 억제 활성은 2, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 12, 51, 85%의 강한 억제 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

3. SNP에 의해 생성되는 NO 억제 활성

SNP에 의해 생성되는 NO에 대한 억제 활성은葫蘆巴추출물 2, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 13, 41, 75%의 억제 활성을 나타내어 기존 NO의 제거제인 carboxy-PTIO보다는 약하지만 비교적 강한 NO 제거능을 나타내었다 (Fig. 3).

4. SIN-1에 의해 생성되는  $\cdot\text{O}_2^-$  억제 활성

SIN-1에 의해 생성되는  $\cdot\text{O}_2^-$ 에 대한 억제 활성은葫蘆巴추출물 2, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 10, 34, 82%의 제거 활성을 나타내어 강한  $\cdot\text{O}_2^-$  생성 억제 활성을 나타내었다 (Fig. 4).

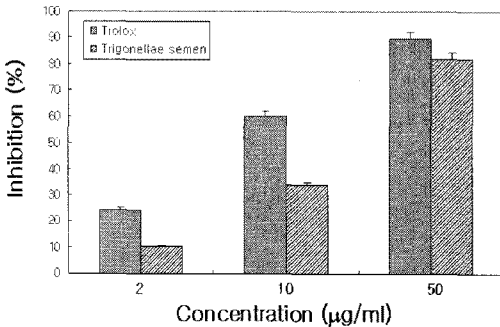


Fig. 4. Effect of *Trigonellae Semen* on SIN-1-induced reactive species generation. *Trigonellae Semen* (2, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) and SIN-1 were added to each well. The generation of reactive species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean $\pm$ S.D.

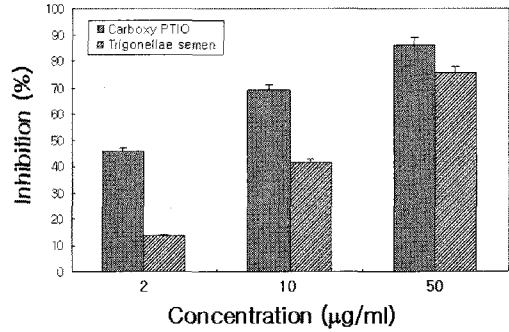


Fig. 3. Effect of *Trigonellae Semen* on SNP-induced NO generation. *Trigonellae Semen* (2, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) and SNP were added to each well. The generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean $\pm$ S.D.

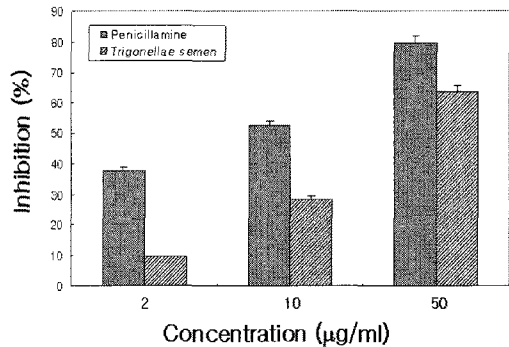


Fig. 5. Effect of *Trigonellae Semen* on LPS-induced ONOO<sup>-</sup> generation in mouse kidney. Mice were injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. *Trigonellae Semen* (2, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) and postmitochondria of the mouse kidney were added to each well. The generation of reactive species was measured by DHR 123 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean $\pm$ S.D.

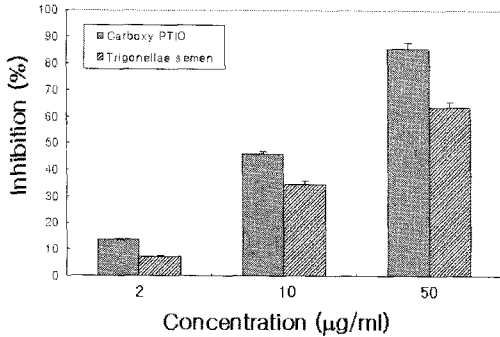


Fig. 6. Effect of *Trigonellae Semen* on LPS-induced NO generation in mouse kidney. Mice were injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. *Trigonellae Semen* (2, 10, 50 µg/ml) and postmitochondria of the mouse kidney were added to each well. The Generation of reactive species was measured by DAF-2 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.D.

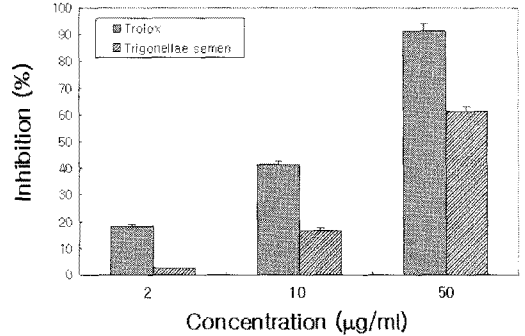


Fig. 7. Effect of *Trigonellae Semen* on LPS-induced reactive species generation in mouse kidney. Mice were injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. *Trigonellae Semen* (2, 10, 50 µg/ml) and postmitochondria of the mouse kidney were added to each well. The generation of reactive species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.D.

5. LPS 처리 마우스 신장 균질액에서 ONOO<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 및 NO 생성에 미치는 영향

LPS로 활성산소 및 질소 생성체를 유도한 신장 균질액에서 ONOO<sup>-</sup>, NO 및 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 억제 활성을 관찰한 결과 葫蘆巴추출물 2, 10, 50 µg/ml 농도에서 ONOO<sup>-</sup> 생성을 각각 9, 28, 63% 억제하였고 (Fig. 5), NO 생성에 대하여 각각 7, 34, 63% 억제하였다 (Fig. 6). 또한 활성산소 생성을 각각 2, 16, 61% 억제하였다 (Fig. 7).

6. LPS 처리 마우스에서 NF-κB 단백질 발현에 미치는 영향

노화지표 단백질인 p65의 단백질 발현을 관찰한 결과 정상군에 비하여 LPS를 처리한 대조군에서 증가되었으나 葫蘆巴추출물을 투여하고 LPS를 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였다 (Fig. 8).

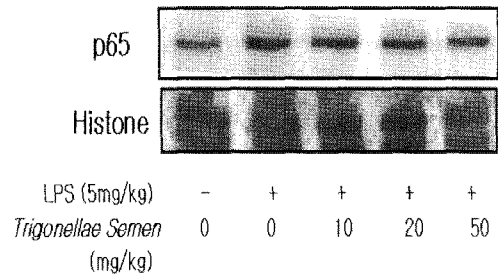


Fig. 8. Effect of *Trigonellae Semen* on LPS-induced p65. Western blot was performed to detect p65 protein level in nuclear fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Trigonellae Semen* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection.

7. LPS 처리 마우스에서 COX-2, iNOS, VCAM-1 단백질 발현에 미치는 영향

염증 인자인 COX-2, iNOS 및 VCAM-1의 발현 정도를 비교하여 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 증가되는 것으로 나타났다. 반면에 실험군에서는 농도 의존적으로 감소되는 경향을 보였다 (Fig. 9-11).

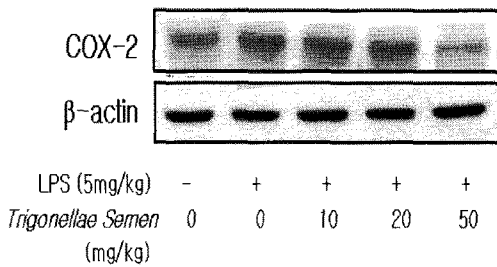


Fig. 9. Effect of *Trigonellae Semen* on LPS-induced COX-2. Western blot was performed to detect COX-2 protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Trigonellae Semen* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection.

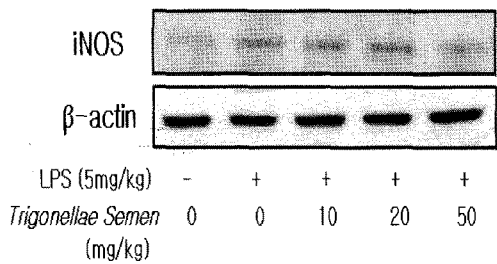


Fig. 10. Effect of *Trigonellae Semen* on LPS-induced iNOS. Western blot was performed to detect iNOS protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Trigonellae Semen* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection.

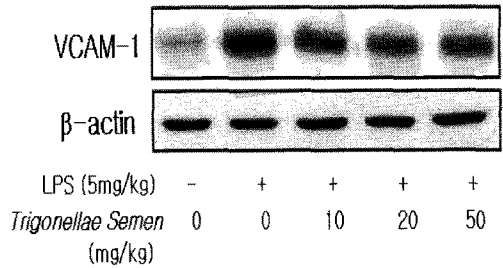


Fig. 11. Effect of *Trigonellae Semen* on LPS-induced VCAM-1. Western blot was performed to detect VCAM-1 protein level in cytosol fractions from mouse kidney. Mice were administrated *Trigonellae Semen* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection.

IV. 考 察

최근 제안된 "Inflammation Hypothesis of Aging"<sup>20</sup>에 의하면 노화 과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO<sup>-</sup> 생성을 더욱 증가시켜 세포 및 조직 손상을 가져와 노화 과정을 촉진한다고 하였다.

ONOO<sup>-</sup>는 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다<sup>3-7</sup>. 이러한 독성 작용으로 인해 ONOO<sup>-</sup>는

노화 과정뿐만 아니라 노인성 질환에 중요한 발병 요인으로 주목받고 있는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질이다<sup>4,6,21</sup>. 따라서 인체 내에는 특이하게 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 효소가 밝혀져 있지 않으므로 한약재로부터 ONOO<sup>-</sup> 제거 활성을 탐색하는 것은 큰 의의가 있다.

본 실험에 사용된 葫蘆巴는 性溫 味苦하고 命門, 腎, 肝經에 歸經하여 壯元陽 暖丹田 逐寒濕 등의 효능으로 陽痿, 滑泄, 疝氣 등에 활용되고 있다<sup>12-14</sup>. 실험 연구에 의하면 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시켜 발기부전을 유도한 흰쥐의 음경해면체 조직중의 nitric oxide synthase 활성, nitrite 및 glutathione 함량을 증가시키고 과산화지질의 함량을 감소시켰다고 보고하였다<sup>22</sup>. 한의학에서 腎虛를 노화의 주요 원인으로 인식하므로 葫蘆巴는 노화를 억제할 가능성이 기대되는 약물이다. 따라서 葫蘆巴가 노화 과정과 노인성 질환 및 여러 만성질환들과 밀접한 관계를 가지고 있는 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 작용이 있는지를 검토하고 노화와 관련된 염증성 단백질의 발현에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

葫蘆巴의 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 능력을 ONOO<sup>-</sup>과 특이하게 반응하여 형광을 내는 DHR 123을 이용하여 측정된 결과, 葫蘆巴추출물이 ONOO<sup>-</sup> 자체를 강력히 제거할 뿐만 아니라, SIN-1에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup>에 대해서도 강력하게 억제하는 활성을 나타내었다. 또한 ONOO<sup>-</sup>의 전구체인  $\cdot O_2^-$ 에 대하여 葫蘆巴추출물이 직접 제거하는 활성을 나타내었으며, SIN-1에 의해 생성되는  $\cdot O_2^-$ 와 SNP에 의해 생성되는 NO에 대하여도 억제 효과를 나타내었다. 따라서 葫蘆巴의 ONOO<sup>-</sup> 억제능에는 ONOO<sup>-</sup>를 직접 제거하는 활성과  $\cdot O_2^-$ 와 NO를 각각 제거하는 능력을 가지고 있으므로 ONOO<sup>-</sup> 축적을 억제할 것으로 사료된다.

LPS로 활성산소 및 활성질소 생성계를 유도한 신장의 균질액에서 葫蘆巴추출물은 ONOO<sup>-</sup> 및 그 전구체인  $\cdot O_2^-$ 와 NO 생성을 억제하였다. 이러한

결과는 葫蘆巴추출물이 ONOO<sup>-</sup> 생성을 억제할 뿐만 아니라, 그 전구체인 활성산소와 활성질소에 대하여도 생성을 억제하므로 효과적으로 ONOO<sup>-</sup> 제거 및 억제 활성을 나타낸다고 사료된다.

따라서, 葫蘆巴는 이러한 생체내 항산화제를 강화하는 작용을 통해 여러 가지 외인성 자극에 의해 발생한 산화적 스트레스를 저하시키는 것으로 사료된다. 또한 활성산소를 소거함으로써 과도하게 생성된 활성산소가 세포내 항산화 방어체를 억제하는 것을 막는 것으로 여겨진다.

COX-2는 cytokine 등의 여러 염증 자극에 대한 반응으로 나타나는데, 뇌를 제외한 대부분의 조직에서는 자극이 없으면 나타나지 않지만 급만성 염증 등과 같은 병태학적인 조건에서는 고농도로 유리된다<sup>21</sup>. 그리고 성장인자와 mitogen에 유도되어 지속적인 PGs 분비를 통한 다양한 만성 염증 질환, 즉 류머티스성 관절염, 궤양성 대장염, Crohn's disease, helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 간경변 유발시 혈관 이완과 혈관신생에도 관여한다<sup>23,24</sup>.

NF- $\kappa$ B의 활성화와 그것에 의한 유전자 발현은 노화, 암, 동맥경화증, 방사능에 의한 조직 손상, 바이러스성 복제, 급성 염증상태, 조직이식 숙주반응, 독성/부패성 조직 손상 등을 포함하는 여러 가지 병리적인 상태와 관련되어 있다. 또한 노화 과정과 노인성 질환에는 NF- $\kappa$ B의 활성화를 초래하는 RS 반응이 밀접하게 관련된다<sup>11</sup>.

염증 인자 단백질의 발현에 미치는 영향을 검토한 실험에서 LPS 처리에 의해 COX-2, iNOS 및 VCAM-1 단백질 발현이 증가되었으나 葫蘆巴추출물을 경구투여한 경우에 억제되는 것으로 나타났다. 또한 葫蘆巴추출물은 노화지표 단백질인 NF- $\kappa$ B (p65)의 발현이 LPS 처리에 의해 증가되는 것을 농도 의존적으로 억제하였다. 그러므로 葫蘆巴가 활성산소를 억제하는 항산화 효과에 의해서 염증 인자들을 억제시키는 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, 葫蘆巴는



ONOO<sup>-</sup>, 활성산소 및 활성질소를 소거하고 생성을 억제할뿐만 아니라 노화와 관련된 여러 가지 염증 인자 단백질의 발현을 억제하여 노화 과정 및 노인성 질환을 조절하는데 유효한 약제가 될 것으로 사료된다.

## V. 결 론

葫蘆巴가 노화 과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 ONOO<sup>-</sup> 및 그 전구체인  $\cdot O_2$ 와 NO에 대한 제거능과 노화 지표 단백질인 iNOS, COX-2, VCAM-1 및 NF- $\kappa$ B의 발현에 미치는 영향을 검토하였다.葫蘆巴추출물은 ONOO<sup>-</sup>를 농도 의존적으로 직접 소거하였고, SIN-1에 의한 ONOO<sup>-</sup>의 생성을 억제하였다. 또한 SIN-1에 의해 생성되는  $\cdot O_2$ 와 SNP에 의해 생성되는 NO에 대하여葫蘆巴추출물은 억제 효과를 나타내었다.葫蘆巴추출물은 LPS 처리로 산화 스트레스를 유도한 마우스의 신장 homogenate에서 ONOO<sup>-</sup>, NO 및  $\cdot O_2$ 의 생성을 효과적으로 억제하였다.葫蘆巴추출물은 LPS 처리로 증가된 NF- $\kappa$ B (p65)의 발현을 억제하였고 iNOS, COX-2 및 VCAM-1의 발현도 억제하였다. 이상의 결과로서葫蘆巴는 ONOO<sup>-</sup>를 효과적으로 소거하고 염증 인자 단백질의 발현을 억제하여 노화 및 노인성 질환의 조절 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

## 參考文獻

1. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:651-68.
2. 平田結善緒. NO and NOS. 內分泌, 糖尿病科. 1996;2:207-14.
3. Carr AC. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species:

reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1716-23.

4. Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW, Yu BP. The inflammatory process in aging. *Reviews in Clinical Gerontology.* 2000;10:207-22.
5. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Chio JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Micro Res Techniq.* 2002;59:264-72.
6. Haenen GPMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophy Res Commu.* 1997;236:591-6.
7. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophy Res Commu.* 1997;232:164-70.
8. Kim HJ, Kim KW, Yu BP, Chung HY. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression : NF- $\kappa$ B activation and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. *Free Radical Biol Med.* 2000;28:683-92.
9. Nathan CF, Hibbs JB. Roles of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 1991;1:65-70.
10. Ghost S, May MJ, Kopp EB. NF- $\kappa$ B and Rel proteins : Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.
11. Korhonen P, Helenius M, Salminen A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. *Neurosci Lett.* 1997;225:61-4.
12. 李尙仁. 本草學. 서울:醫藥社:1981, p.93-4.

13. 吳儀洛. 本草從新. 上海:上海科學技術出版社:1982, p.85-6.
14. 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社:1983, p.1542-3.
15. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧:遼寧科學技術出版社:1989, p.53-4, 327-9, 331-4.
16. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun.* 1994;16:149-56.
17. Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 1983;134:111-6.
18. Nagata N, Momose K, Ishida Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem Tokyo.* 1999;125:658-61.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
20. Chung HY, Kim HJ, and Kim JW. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:327-335.
21. Chung HY, Soung DY, Kim AR, Choi HR, Kim HJ, Choi JS, Yang R, Lee KH and Yu BP. Generation, Toxicity and Scavenging of ONOO<sup>-</sup>: Its Involvement in the Aging Process. *Kor J Gerontol.* 2000;10:46-59.
22. 김광진, 강정준, 신현철, 윤철호, 서종은, 정지천, 신익섭. 葫蘆巴추출물의 발기부전 개선 효과에 관한 실험적 연구. *한방성인병학회지.* 1998;4(1):210-22.
23. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver disease. *J Hepatol.* 1993;17(2):S38-40.
24. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998;93(5):705-16.