

마우스 대식세포에서 血竭(Draconis Resina)의 항산화 및 항염증 효과

이효승[#], 허숙경, 윤현정, 최재우, 정재하, 박선동^{*}

동국대학교 한의과대학 심혈관계질환 천연물연구개발센터 · 방제학교실

Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of Draconis Resina in Mouse Macrophage Cells

Hyo-Seung Yi[#], Sook-Kyoung Heo, Hyun-Jeong Yun, Jae-Woo Choi,
Jae-Ha Jung, Sun-Dong Park^{*}

Cardiovascular Medical Research Center and Department of Prescriptionology,
Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : Draconis Resina (DR) has been used as a traditional Korean herbal medicine since ancient times, and today it is used as a medication for wounds, tumors, diarrhea, rheumatism, in the itching of insect bites and with other conditions in the folk medicine. The aim of this study was to determine whether fractionated extracts of DR inhibit free radical generation, intracellular oxidation, production of nitrite, an index of NO, PGE2, iNOS, COX-2 and proinflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 macrophages.

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

Results : Our results indicated that fractionated extracts, especially dichloromethane and ethyl acetate extracts, significantly inhibited free radical generation, the LPS-induced H2O2, NO, PGE2 production and iNOS, COX-2 expression accompanied by an attenuation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 formation in macrophages.

Conclusions : Our results indicate that dichloromethane and ethyl acetate extracts of DR have potential as an agent of chronic inflammatory diseases.

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

· Tel : 054-770-2654 · E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

제1저자 : 이효승, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실

· Tel : 054-770-2654 · E-mail : neokkk@hanmail.net

· 접수 : 2008년 5월 23일 · 수정 : 2008년 6월 12일 · 채택 : 2008년 6월 20일

Key words : Draconis Resina (DR), anti-oxidation, anti-inflammation, chronic inflammatory

서론

血竭(Draconis Resina, DR)은 棕櫚科(Palmae)에 속한 麒麟竭 (*Daemonorops draco* BL)의 과실과 나무줄기에서 채취한 수지이다. 한방에서 혈갈은 瘀血을 없애주고 痛症을 완화시키며 止血하고 새살이 돋아나게 하는 효능이 있어서 打撲傷, 內傷의 鬱血에 의한 疼痛, 外傷 出血이 멎지 않는 증상, 下腿潰瘍 등을 치료하는데 사용되어 왔다¹⁾. 혈갈은 暗紅色을 띠고, 無味·無臭하며, 물에는 녹지 않고 알콜이나 에테르에 녹는 성질을 갖고 있다²⁾. 알려진 구성성분으로는 dracorubin, dracorhodin, dracoresinotannol, abietic acid 등이 있고, cinnabarone, dracoresene, benzoic acid 등의 성분도 함유하고 있다고 보고되었다³⁾. 혈갈의 생리활성과 치료학에 대한 실험연구는 항세균과 항바이러스 효과⁴⁻⁵⁾ 항종양 효과⁶⁻⁹⁾, 지혈과 항혈전 효과¹⁰⁻¹¹⁾ 등이 나와 있고, 최근에 혈갈의 에탄올 추출물을 이용하여 마우스 대식세포에서 항염증 효과에 대한 연구결과가 발표되었다¹²⁾. 그러나 혈갈의 획분층별 추출물을 이용한 항산화 및 항염증 효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 혈갈의 획분층별 항산화 효과와 항염증 효과의 연관관계 및 그 기전을 밝히는 것은 중요한 의미가 있다고 할 수 있다.

세포 내에 존재하는 미토콘드리아, 피옥시즘, xanthine oxidase (XOD), NADPH oxidase 및 cyclooxygenase (COX) 등의 효소들은 $\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $\cdot OH$ 와 같은 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하는데, 이 ROS는 산화손상을 일으키는 주범이 된다. 또한 $\cdot NO$, HNO_2 , $ONOO^-$ 와 같은 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 염증반응 시 대식세포, 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성되며, 이때 ROS도 같이 생성된다¹³⁻¹⁴⁾. 염증반응의 조절은 대단히 복잡한 것으로 알려져 있는데, 이는 생체 내 복구체계의 증강 및 손상을 감소시키기 위한 일련의 활성기전이며, 모든 조직에서 잘 조절되는 것으로 알려져 있다. 그러나 반복되는 조직의 손상이나 재생에 의해 염증반응이 지속되면, 염증 관련 세포에서 ROS와 RNS가 과다 생성되고, 그 결과로 영구적인 유전자의 변형이 야기된다¹⁵⁾. 이처럼 ROS와 RNS는 생체 내 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증반응과 깊이 관련되어 있다.

염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(pro-inflammatory mediators)이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostagrandin E_2 (PGE_2) 등이 있다. 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κB (NF- κB)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE_2 를 생성하여 염증을 일으킨다¹⁶⁻¹⁷⁾. 포유동물 세포의 nitric oxide synthase (NOS)의 경우, 유사형태가 3가지 존재하는데 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), 그리고 inducible NOS (iNOS)이다. 그 중에서 특히 iNOS가 염증반응에 관여하는데, iNOS의 경우 Interferon- γ , lipopolysaccharide (LPS), 그리고 여러 가지 염증성 사이토카인의 자극 있을 때 발현된다. PGE_2 는 cyclooxygenase (COX)에 의해서 Arachidonic acid로부터 생산된다. COX에 대해서는 1990년대 초반에 주로 연구되었는데, 이 또한 유사형태가 2가지 존재한다. COX-1은 거의 모든 조직에 발현되어 있고, prostagrandin을 생산하여 신장의 혈액 흐름을 조절하거나 위장의 세포를 보호하는 등의 생리적인 기능을 조절한다. 반대로 COX-2의 경우는 미생물에 의한 감염이나 손상 혹은 여러 요인의 스트레스에 반응한 대식세포(Macrophage)에서 발현된다. 즉 iNOS와 COX-2의 발현과 NO, PGE_2 의 생산은 면역세포의 대표적인 염증인자이다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β) 등이 포함된다.

최근 합성 항산화제의 부작용들이 밝혀지면서 천연자원으로부터 항산화제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있다. 그리고 뛰어난 항산화 효과를 지닌 물질들이 뛰어난 항염증 작용을 수반하고 있다고 알려진 경우도 많다¹⁸⁻²⁰⁾. 동맥경화를 비롯한 고혈압, 당뇨, 암이나 관절염 등은 대표적인 만성염증성 질환(chronic inflammatory disease)으로 현재 임상에서 이러한 질환이 차지하는 비중은 실로 막대하다. 한방에서는 오랜 역사에 걸쳐서 다양한 천연 자원을 치료제로서 이용해 왔다. 그러므로 항산화 및 항염증 효과를 지닌 천연물을 찾아서, 만성염증성 질환에 사용할 수 있는 치료물질로 개발하는 데, 크게 이바지할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 혈갈을 메탄올 추출하고 그 추출물을 네 가지 유기용매로 희분하여 각각의 항산화 활성을 in vitro 상에서 비교한 다음, 그 중에서 뛰어난 활성을 지닌 희분층을 선택했다. 그리고 선택된 층은 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 1시간 전 처리한 후 LPS를 처리하여 염증반응을 유도시켜서, 약제가 이를 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는지 관찰하였다. 그 지표로서 세포가 방출하는 NO, PGE₂ 생성량과 iNOS, COX-2 발현 정도 뿐만 아니라 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 생성량 등을 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 혈갈은 200 g에, 2,000 ml의 100% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 49.6 g의 메탄올 추출물(수율 24.8%)을 얻었다. 이 메탄올 추출물은 Fig. 1에서와 같이 용매분획하였다.

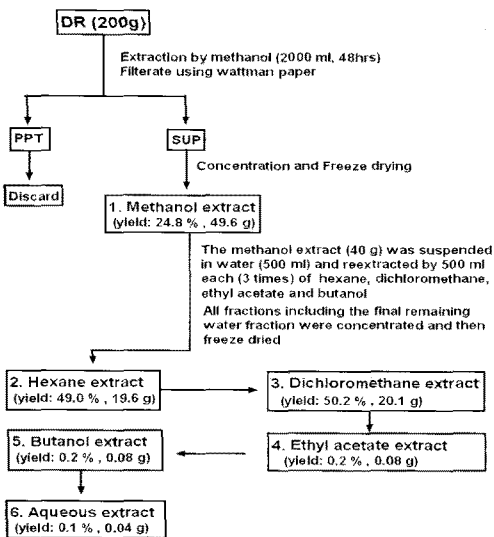


Fig. 1. Extraction and fractionation procedures of DR

2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 Sodium Dodesyl Sulfate (SDS), Acrylamide, Bis는 Bio-Rad사(Hercules, USA)에서 구입하였고, L-ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, hydrogen peroxide (H₂O₂), hypoxanthine, nitro blue tetrazolium (NBT), xanthine oxidase, sodium nitroprusside (SNP), 4,5-diaminofluorecein (DAF-2), 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), CAPS, tween 20, protease inhibitors 등은 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 iNOS monoclonal antibody (mAb)는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA)에서, COX-2 polyclonal antibody와 β -actin mAb는 Cell Signaling Technology사(Beverly, MA)에서 구입하였다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega 사(Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정용 ELISA kit는 Pierce Biotechnology사 (Rockford, USA)에서 구입하였으며, PGE₂ assay kit는 R&D사 (Minneapolis, USA)에서 구입하였다. Protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) Free radical 소거활성 측정

(1) DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Gyamfi 등의 방법²¹⁾에 따라 측정하였다. 먼저 혈갈 희분 층별 시료 50 μ l에 0.1 mM DPPH 용액 1 ml과 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 450 μ l를 가하여 잘 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 30분간 정지한 다음, micro plate reader (VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 파장 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical의 소거활성은 50%의 소거능을 보이는 농도 (IC50)로 표시하였다.

(2) Superoxide anions 소거활성 측정

Superoxide anions 소거활성은 Gotoh와 Niki의 방법²²⁾을 일부 수정하여 측정하였다. 먼저 희분 층별 시료 30 μ l에 30 mM EDTA (pH 7.4) 100 μ l, 30 mM hypoxanthine 10 μ l, 1.42 mM NBT 200 μ l를 가한 다음 실온에서 3분 반응시킨 후에, 0.5 U/ml xanthine oxidase 100 μ l를 첨가하고 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 총 용량을 3 ml로 맞췄다. 반응용액을 실온에서 20분간 배양시킨 후, 560nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 결과는 superoxide radical에 의한 NBT reduction의 IC50 값으로 환산하여 표시하였다.

(3) Nitric oxide 소거활성 측정

Nitric oxide의 소거활성은 Sutherland 등의 방법²³⁾에 의하여 측정하였다. 먼저 1 mg의 DAF-2를 0.55 ml의 DMSO에 용해시키고, 이를 다시 50 mM phosphate buffer를 사용하여 400배(v/v)로 희석해서 DAF-2 용액을 준비해 놓았다. 희분 층별 시료 10 μ l를 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 130 μ l와 혼합한 다음, 40 mM SIN-1 10 μ l 및 DAF-2 용액 50 μ l를 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 10분간 배양한 다음, DAF-2와 NO의 반응에 의해 생성되는 triazolofluorescein의 형광강도를 fluorescence microplate reader (GENios-basic, TECAN, Austria)를 사용하여, excitation 파장 495 nm 및 emission 파장 515 nm에서 측정하였다.

2) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) MTS assay

혈갈 dichloromethane (DCM) 추출물과 ethyl acetate (EA) 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymethyl-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법²⁴⁾으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약제를 농도별 (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml)로 18 시간 동안 처리하였다. Well당 20 μ l의 MTS solution을

첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도는 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교해서 보정하였다.

4) DCF-DA assay

혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물이 H₂O₂와 LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA assay를 실시하였다²⁵⁻²⁶⁾. 먼저 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하고, 약제를 농도별 (10, 30, 60 μ g/ml)로 처리하고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거한 다음, PBS buffer로 희석된 10 μ M DCFH-DA를 가하고, 45분간 배양하였다. PBS buffer로 2회 washing한 다음 4 mM H₂O₂를 가하고, 30분 배양한 뒤에 fluorescence microplate reader를 사용하여, excitation 파장 485nm와 emission 파장 535nm에서 형광강도를 측정하였다. DCF 형광강도의 증가율은 대조군과 비교해서 배수(fold)로 계산하였다. LPS 처리군의 경우는 약제를 처리하고 1시간 배양 후에, 100 ng/ml의 LPS를 가한 다음, 18시간을 배양해서 DCF 형광강도를 측정하였다.

5) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System²⁷⁾을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 60 μ g/ml의 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물을 전처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 배양액 50 μ l와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

6) PGE₂ 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE₂ 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems (Minneapolis, MN)에서 구입하여 실험하였다. 세포에 60 μ g/ml의 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물을 전처리하고 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 PGE₂ 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96

well plate에 각각 100 μ l씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50 μ l와 PGE₂ conjugate 50 μ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 μ l씩 처리하여 5-20분간 반응시킨 후, 50 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간 별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS ; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 세척한 후, lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비 특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체(anti-iNOS, anti-COX₂)를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

8) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 세포에 60 μ g/ml의 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물을 처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 μ l씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100 μ l의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100 μ l의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3

회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzmalonate (TMB) substrate를 100 μ l씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 μ l의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

실험결과는 평균과 표준 편차로 표시하고 유의성 검증은 Sigma Plot (Window용 version 7.0)을 이용하여 Student's t-test를 실시하였다.

결 과

1. 혈갈 획분층의 free radical 소거활성 측정

1) DPPH radical 소거활성 측정

혈갈의 메탄올 추출물과 그 획분층별 추출물 간의 전자 공여능을 비교하기 위하여, DPPH radical에 대한 소거활성을 측정하였다. 본 실험의 결과, 혈갈의 메탄올 추출물의 경우 266.62 μ g/ml의 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였고, 획분층의 경우 hexane 층은 403.07 μ g/ml, dichloromethane층은 136.57 μ g/ml, ethyl acetate 층은 88.15 μ g/ml, butanol층은 90.90 μ g/ml 그리고 aqueous층은 274.84 μ g/ml의 농도에서 50%의 radical을 소거하였다(Fig. 2A). 따라서 혈갈의 획분층 중에서 비교적 우수한 전자공여능을 지닌 것은 dichloromethane, ethylacetate 그리고 butanol층이라고 판단할 수 있었다.

2) Superoxide anions 소거활성 측정

대표적인 활성산소종(reactive oxygen species)의 하나인, superoxide radical에 대한 소거활성의 경우에서는, 메탄올 추출물의 경우 344.48 μ g/ml의 농도에서 50%의 소거활성을 보였고, 획분층의 경우 hexane 층은 효과가 나타나지 않았고(incalculable), dichloromethane층은 186.86 μ g/ml, ethyl acetate층은 298.63 μ g/ml, butanol층은 294.64 μ g/ml 그리고 aqueous층은 887.09 μ g/ml의 농도에서 50%의 소거능을 보였다(Fig. 2B). 본 실험의 결과 혈갈의 획분층에서 비교적 우수한 활성산소종 소거활성을 지닌 것은 DPPH radical 소거활성 실험결과와 같은, dichloromethane, ethylacetate 그리고 butanol층임을 알 수 있었다.

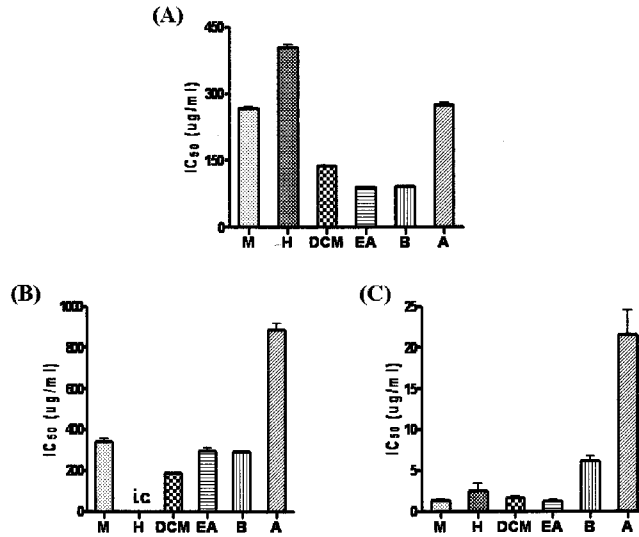


Fig. 2. Scavenging activities of fractionated SD extracts on various free radicals

The results are expressed as IC50 values, and each value represents the mean of three separate experiments. (A) Scavenging activity on DPPH radical. (B) Scavenging activity on Superoxide anions. (C) Scavenging activity on Nitric oxide. * i.c. means incalculable.

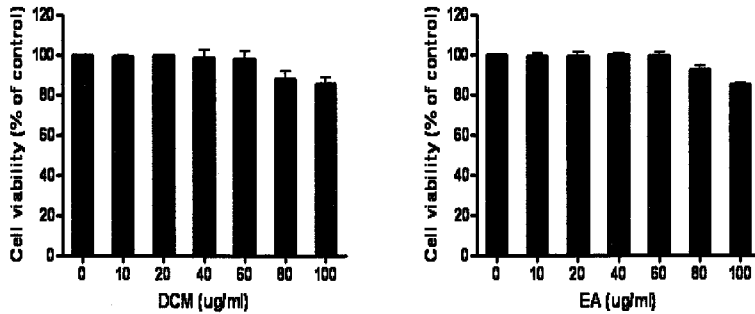


Fig. 3. Effect of DCM and EA extracts on the cell viability of RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml) of DCM and EA extracts for 18 hr. Cell viability was measured by MTS assay as described in Materials and Methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

3) Nitric oxide 소거활성 측정

활성질소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 염증 반응의 중요한 작용인자로 알려진 nitric oxide(NO)에 대한 혈갈 획분층의 소거효과를 in vitro 상에서 관찰하기 위하여, SNP를 사용하여 NO의 생성을 유도하고, 이로 인해 생성되는 DAF-2의 형광강도를 측정하였다. 그 결과 메탄올 추출물의 경우 1.39 µg/ml의 농도에서, 획분층의 경우 hexane층은 2.48 µg/ml, dichloromethane층은 1.69 µg/ml, ethyl acetate층은 1.28 µg/ml, butanol층은 6.22 µg/ml 그리고 aqueous

층은 21.49 µg/ml의 농도에서 50%의 소거활성을 보였다(Fig. 2C). 따라서, 혈갈의 획분층 중에서 아주 우수한 NO 소거활성을 지닌 것은 dichloromethane과 ethylacetate층이라고 판단할 수 있었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, DPPH radical, 활성산소종과 활성질소종 소거활성이 모두 뛰어난 층은 dichloromethane과 ethylacetate층이라는 결론을 내릴 수 있었고, 이 두 층을 선별하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 실험을 진행하였다.

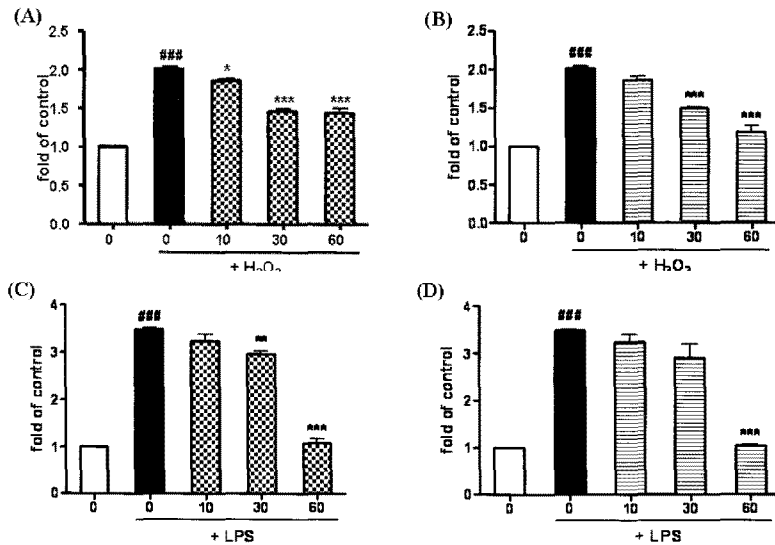


Fig. 4. Inhibitory effect of DCM and EA extracts on intracellular oxidation in RAW 264.7 induced by LPS and H2O2

RAW 264.7 cells were preincubated with 10, 30, 60 μg/ml of DCM and EA extracts for 18 hr. 100 ng/ml of LPS and 4 mM H₂O₂ were treated to induce intracellular oxidation. The increase of DCF fluorescence was calculated at increasing fold of control. (A) Effect of DCM extract on intracellular oxidation induced by H₂O₂. (B) Effect of EA extract on intracellular oxidation induced by H₂O₂. (C) Effect of DCM extract on intracellular oxidation induced by LPS. (D) Effect of EA extract on intracellular oxidation induced by LPS. Data are represented as mean±SEM. Significantly different from control (#) or LPS · H₂O₂ alone (*): * : P < 0.05, ** : P < 0.01, ###, *** : P < 0.001.

2. 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 약재의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물을 농도별(0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg/ml)로 18시간 동안 처리한 결과, 60 μg/ml의 농도까지는 독성이 나타나지 않았지만, 80 μg/ml 이상의 농도에서는 세포의 생존율을 10% 이상 감소시켰다(Fig. 3). 그래서 혈갈의 추출물이 RAW 264.7의 세포 생존율에 영향을 주지 않는 60 μg/ml의 농도로 다음 실험을 진행하였다. 이는 혈갈 추출물이 보여주는 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약제들의 고유한 특성을 말한다.

3. 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물의 RAW 264.7 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과

혈갈 DCM과 EA 추출물이 H₂O₂와 LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를

DCF-DA assay를 통하여 검토하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 10, 30, 60 μg/ml의 DCM, EA 추출물을 각각 전처리한 다음, H₂O₂와 LPS로 세포의 산화적 손상을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여, H₂O₂와 LPS를 단독 처리한 실험군에서 유의성있는 형광강도의 증가를 보였다. 이로써 H₂O₂와 LPS의 처리가 RAW 264.7 세포의 산화적 손상을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. 반면 혈갈 DCM과 EA 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 세포의 산화적 손상을 억제하였음을 알 수 있었다(Fig. 4). H₂O₂ 단독 처리군의 경우 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 2.0배 정도로 형광강도가 증가한 반면, 60 μg/ml의 DCM 추출물 처리군과 EA 추출물 처리군은 각각 1.44배, 1.18배 증가하여 효과적으로 산화적 손상을 방어하였다(Fig. 4A, 4B). 그리고 LPS 단독 처리군의 경우, 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 3.48배 정도로 형광강도가 증가한 반면, 60 μg/ml의 DCM 추출물 처리군과 EA 추출물 처리군은 각각 1.09배, 1.04배 증가하여 거의 대조군 수준으로 산화적 손상을 억제하였음을 알 수 있었다(Fig. 4C, 4D).

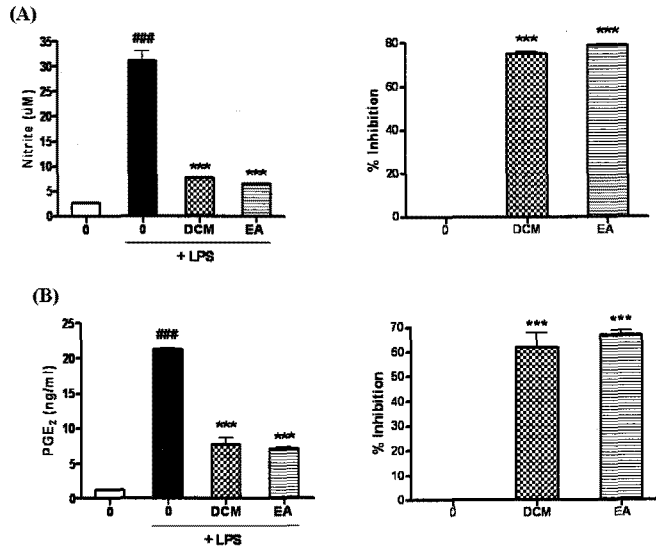


Fig. 5. Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by DCM and EA extracts

RAW 264.7 cells were preincubated with 60 µg/ml of DCM and EA extracts for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. (A) The NO production was measured by Griess Reagent System. (B) The PGE₂ production was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); ###, ***: P < 0.001.

4. RAW 264.7 세포에서 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물이 LPS로 유도된 NO와 PGE₂의 생성량에 미치는 영향

먼저 염증 유발 물질로 주로 사용되는 LPS를 사용하여 염증 유발에 필요한 적절한 농도를 조사하였다. RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별(0, 1, 10, 100 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 후 Griess Reagent를 사용하여 조사한 결과 NO의 생성량이 농도 의존적으로 증가되었으며(data not shown), 100 ng/ml의 농도에서 가장 효과가 있었는데 약 10배 증가되었다. 또한 PGE₂의 생성량을 ELISA 방법을 이용하여 조사한 결과 LPS의 농도별로 증가하였고(data not shown), 100 ng/ml의 농도에서 약 20배 증가되었다. 약제의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 DCM과 EA 추출물 60 µg/ml을 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성량에 미치는 영향을 같은 방법으로 조사한 결과, DCM 추출물의 경우에는 74.88% 감소시켰고, EA 추출물은 78.70% 감소시켰다(Fig. 5A). LPS에 의해 유도되는 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, DCM 추출물의 경우에는 67.92% 감소시켰고, EA 추출물은 66.75% 감소시켰다(Fig. 5B). 따라서 혈갈의 DCM 추출물과

EA 추출물 모두 LPS로 유도된 NO와 PGE₂을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

5. RAW 264.7 세포에서 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물이 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향

염증에 관여하는 NO는 보통 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서, PGE₂는 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해서 만들어진다. 그래서 RAW 264.7 세포에서 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물이 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 알아보기로 하였다. 우선 염증 유발 물질로 주로 사용되는 LPS를 사용하여 iNOS와 COX-2의 발현을 조사해 본 결과, LPS 100 ng/ml에서 대조군에 비하여 현저히 증가하였다(data not shown). 약제의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 약제 60 µg/ml의 농도를 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 iNOS의 발현에 미치는 영향을 같은 방법으로 조사한 결과, DCM 추출물의 경우 98.36%, EA 추출물의 경우에는 97.76% 감소시켰다(Fig. 6A). 또한, LPS에 의해 유도되는 COX-2 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, DCM 추출물의 경우 93.43%, EA 추출물의 경우

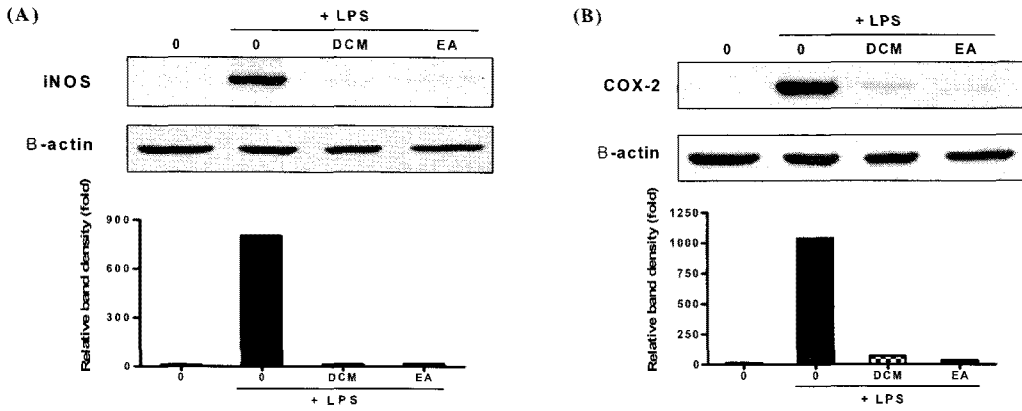


Fig. 6. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 expression by DCM and EA extracts

RAW 264.7 cells were preincubated with 60 μ g/ml of DCM and EA extracts for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The expression levels of iNOS and COX-2 were determined by western blotting as described in Materials and Methods. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 7.5% SDS-PAGE. β -actin levels were used as internal markers for loading variation.

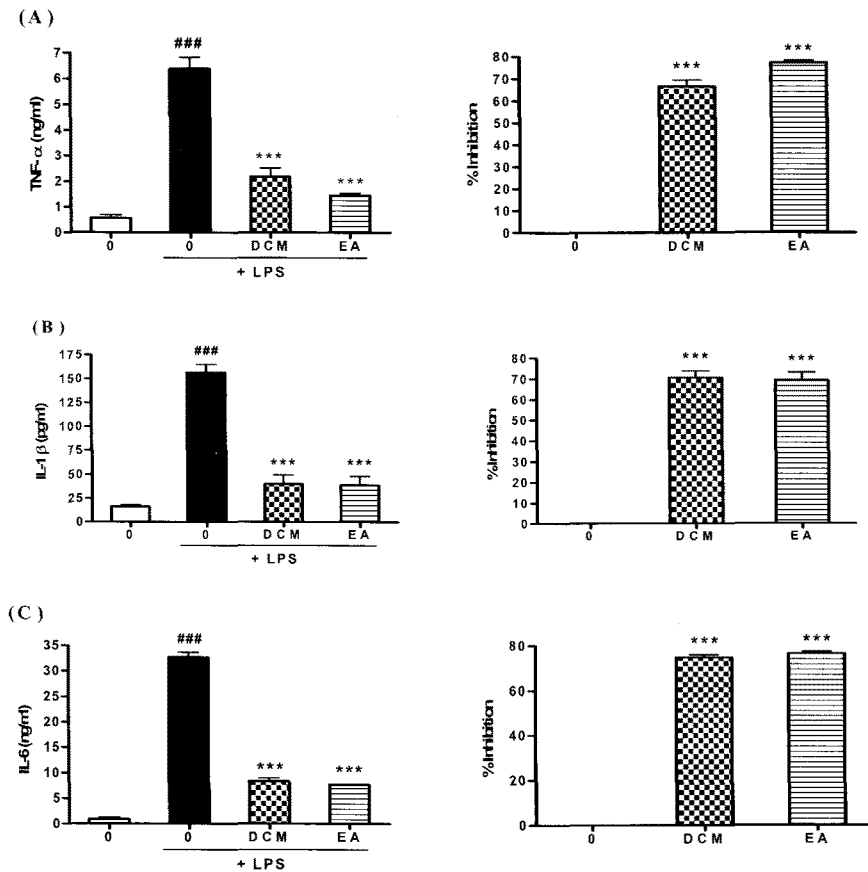


Fig. 7. Inhibition of LPS-induced TNF- α , IL-1 β and IL-6 by DCM and EA extracts

RAW 264.7 cells were preincubated with 60 μ g/ml of DCM and EA extracts for 1 hr and then treated with 100 ng/ml of LPS for 18 hr. The TNF- α , IL-1 β and IL-6 production was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); ##, *** : $P < 0.001$.

우에는 96.98% 감소시켰다(Fig. 6B) 이 실험의 결과 DCM 추출물과 EA 추출물 모두 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

6. RAW 264.7 세포에서 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향

염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)은 염증을 나타내는 중요한 지표이다. 따라서 RAW 264.7 세포에서 혈갈 DCM 추출물과 EA 추출물이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향을 알아보기로 하였다. 우선 RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별(0, 1, 10, 100 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 후 염증성 사이토카인의 생성하는 적절한 농도를 조사하였다. 그 결과 LPS의 농도에 의존적으로 생성량이 증가하였고, 그 중 100 ng/ml의 농도에서 TNF- α 는 4.3배, IL-1 β 는 6.2배, IL-6는 57.3배 증가되어서 가장 효과적으로 염증성 사이토카인들이 유도 되었으므로(data not shown), 100 ng/ml 농도의 LPS를 사용하기로 하였다. 그 다음으로 약제의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 약제 60 μ g/ml의 농도를 1시간 동안 전 처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리하여 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, DCM 추출물의 경우에는 66.50% 감소시켰고, EA 추출물은 77.23% 감소시켰다(Fig. 7A). LPS에 의해 유도되는 IL-1 β 의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, DCM 추출물의 경우에는 70.57% 감소시켰고, EA 추출물은 69.38% 감소시켰다(Fig. 7B). 또한, LPS에 의해 유도되는 IL-6의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, DCM 추출물의 경우에는 74.71% 감소시켰고, EA 추출물은 76.44% 감소시켰다(Fig. 7C). 이 결과 DCM 추출물과 EA 추출물 모두 LPS로 유도된 proinflammatory cytokines을 비슷하게 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고, TNF- α 의 생성량에 있어서는 EA 추출물이 더 우수한 것으로 나타났다.

고찰

2002년 통계청에서 발표한 사망원인통계 자료를 보면, 남녀 모두 1위 암, 2위 뇌혈관질환, 3위 심장질

환으로 나타났다. 최근 10년간 순환기계질환에 의한 사망률 변화를 보면 인구 십만 명 당 92년 156.0명에서 2002년 127.8명으로, 전체적으로 감소한 것으로 나타났다. 이는 순환기계질환 중 고혈압성 질환과 뇌혈관 질환에 의한 사망률이 감소했기 때문인데, 주목할 점은 순환기계질환 중 심근경색 등의 허혈성 심장질환의 사망률은 오히려 늘었다는 사실이다. 허혈성 심장질환은 혈액을 공급하는 관상동맥이 경화되어 혈관이 탄력을 잃고 부분적으로 막혀서 심근으로 혈액을 원활하게 공급하지 못해 발생하게 되는데, 동맥경화증은 동맥이 약 70% 폐색이 되어도 특정한 증상이 아닌 막연하고 애매한 증상들을 호소하고 통증이 분명한 질환이 아닌데다가, 노화에 따라 누구에게나 점진적으로 진행된다는 점에서 더욱 중요성이 있다²⁸⁾.

동맥경화증의 원인에 관한 이론들 중에서 아직까지 확실한 이론은 없다. 노화이론, 대사이론, 스트레시이론, 호르몬 이론, 바이러스 혹은 독성 요인설, 다요인설 등의 여러 이론이 있지만 논쟁이 계속되고 있다. 최근에는 동맥경화의 발생이론이 크게 두 가지 측면에서 접근되고 있는데, 첫 번째로 '손상에 대한 반응가설(reaction to injury hypothesis)'이 있다. 이 가설은 죽상동맥경화증이 손상에 대한 반응으로 시작된다는 것으로 염증반응과 밀접한 관련이 있다. 동맥경화의 발생에 염증 반응이 관여한다는 기본적인 근거는 병리학적인 관찰에 기인하는데, 죽상동맥경화반 내에서 단핵구를 위시하여 대식세포와 T 임파구 등의 염증세포들의 침윤이 발견되기 때문이다²⁹⁾. 특히 혈관 내피세포(vascular endothelial cell)와 평활근 세포(smooth muscle cell)에서 이런 염증세포의 침윤이 두드러지게 나타난다³⁰⁾. 두 번째로 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의한 가설이 있다. 우리 몸은 항상성 유지를 위해 산화촉진물(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)들이 균형을 이루고 있다. 만약 이 균형이 깨져서 산화 촉진 쪽으로 기울게 되면 세포에 유해한 작용을 하게 되는데, 이를 산화적 스트레스라고 한다. 이런 산화적 스트레스는 기본적으로 노화와 밀접한 관련을 갖고 있으며, 체내 DNA 손상, 지질의 과산화로 인한 세포막의 손상, 단백질과 지질의 산화 등을 가져와 동맥경화나 암, 백내장, 노인성 치매, 파킨슨씨병과 같은 질환 등을 유발 시킨다³¹⁾. 특히 동맥경화의 경우에서 Kunsch와 Medford 등의 연구에 의하면³²⁾, 여러 가지 죽상동맥경화의 위험 인자들이 공통적으로 혈관세포 내 산화스트레스(oxidative stress)를 증가시키고, 이에 따라 2차적으로 redox-sensitive signaling pathway와 transcription factor를

활성화함으로써 혈관세포와 면역세포의 상호작용에 의한 염증을 유발하고, 혈관기능의 장애를 초래하여 죽상동맥경화를 유발한다고 밝혔다. 따라서 항산화와 항염증 효과를 동반한 천연물은 동맥경화와 같은 만성 염증성 질환(chronic inflammatory disease)의 예방 및 치료제 개발에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

혈갈의 메탄올 추출물과 획분층들의 항산화 효과를 비교해 보기 위해 가장 먼저 DPPH radical scavenging activity를 수행하였다. 일반적으로 항산화제는 보라빛의 DPPH radical (DPPH·)을 무색의 (DPPH-H) 형태로 전환시키는데, 혈갈의 획분층 중 DCM, EA, B 추출물에서 가장 우수한 IC50값을 보였다(Fig. 2A). superoxide radical은 산소를 이용하는 생체 내의 정상적인 대사과정에서 생성될 뿐만 아니라, organic compound들의 자동산화(autoxidation), 외부로부터 침입한 이물질에 대한 대식세포의 탐식작용(phagocytosis) 및 효소반응에 의하여 생성될 수 있다. 게다가, superoxide anions는 hydrogen peroxide의 생성 전구물질이며, 특히 Fenton계 반응을 통하면 보다 강한 활성을 지닌 hydroxyl radical의 생성을 유발시킨다³³⁾. 최근 혈관세포를 이용한 연구들에서 superoxide radical은 주로 생체 내에서 NAD(P)H oxidase와 xanthine oxidase의 반응에 의해 생성되며, 이는 동맥경화 발병의 초기 단계에서 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다³⁴⁻³⁵⁾. 본 실험에서는 xanthine oxidase를 hypoxanthine과 반응시켜서 superoxide radical을 생성시켰으며, 생성된 superoxide radical은 hypoxanthine을 uric acid로, NBT를 환원형 diformazan으로 변환시킨다³⁶⁾. 실험결과, 혈갈의 획분층 중에서 역시 DCM, EA, B 추출물에서 가장 강한 소거능이 관찰되었다(Fig. 2B). 생체 내 혈관내피세포에서는 superoxide radical과 nitric oxide가 생성될 수 있으며, 이들의 상호반응에 의하여 혈관세포벽 내에서 peroxynitrite가 생성되는데 이러한 일련의 반응 과정에서 LDL의 산화적 변형과 혈관내피세포의 산화적 손상이 야기될 수 있다고 알려져 있다³⁷⁻³⁸⁾. 특히 superoxide radical과 nitric oxide의 반응으로 생성되는 peroxynitrite는 그 반응성이 superoxide와 hydrogen peroxide보다도 강력하지만, 생체 내 방어기구는 아직까지 알려진 바가 없다³⁹⁾. 본 실험에서 혈갈 획분층의 nitric oxide에 대한 소거활성을 비교하기 위하여 SNP로 nitric oxide를 생성시키고 이를 DAF-2로 포집하여 형광강도를 측정된 결과, DCM과 EA 추출물에서 효과적인 nitric oxide 소거활성이 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 이상의 결과를 바탕으로 혈갈의 추출물

중에서 DCM과 EA 추출물이 전체적으로 가장 뛰어난 항산화 활성이 있다고 판단하고, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 MTS assay를 실행하여 세포독성이 없는 약제의 농도를 선정하였다(Fig. 3). 그리고 LPS와 H₂O₂를 산화 유발제로 사용하여 DCM, EA 추출물이 RAW 264.7 세포의 세포 내 산화를 얼마나 효과적으로 방어하는지 DCF-DA assay를 통해서 확인했다. DCF-DA는 세포에 전처리하면 세포 안으로 쉽게 들어가고, H₂O₂와 만나면 형광을 띠는 DCF를 생성하게 되므로 DCF의 형광강도를 측정하면 세포 안의 ROS 생성량을 측정할 수가 있다. 그리고 LPS는 세포 안의 ROS를 효과적으로 유발시키는 물질로 알려져 있다⁴⁰⁾. 이 실험의 결과 DCM과 EA 추출물 모두 세포 안의 ROS 생성을 농도의존적으로 억제함을 알 수 있었고(Fig. 4), in vitro 상의 항산화 활성이 세포 안에서도 유효함을 확인할 수 있었다.

염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, PGE₂, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 염증반응이 시작되면 염증반응의 전사인자인 NF-κB가 활성화되는데, NF-κB의 활성화는 먼저 IL-1β, IL-6, IL-8과 TNF-α를 포함하는 일부 주요 염증촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하며, 또 COX-2와 iNOS의 활성화를 조절하여 염증반응 전반에 걸쳐 중요한 역할을 한다⁴¹⁾. 동맥경화증의 경우도 지속적인 NF-κB의 활성화에 의한 염증 및 혈관 평활근세포의 증식과정으로 인해 일어나는 것으로, 동맥경화 병변부위에서 평활근세포, 대식세포 및 혈관내피세포의 NF-κB의 활성이 증가되어 있으며, 잠정적 병인인자인 oxidized LDL 또한 NF-κB의 활성을 촉진하는 것으로 보고되어 있다⁴²⁾. NF-κB 활성화에 관여하는 인자들에는 TNF-α, lymphotoxin, IL-1β, IL-6와 같은 여러 가지 염증성 사이토카인들, mitogens, lipopolysaccharide(LPS), 단백질 합성 저해제, 산화적 스트레스, 자외선, phorbol esters 등이 있는데⁴³⁾, 흥미로운 점은 이 물질들이 대부분 ROS를 발생하는 것으로 알려져 있고, 이 NF-κB 활성화는 화학적으로 광범위한 항산화제에 의해 저해된다는 사실이다⁴⁴⁾. 이러한 연구는 NF-κB 활성화가 대부분 산화반응에 의해 촉진됨을 보여주는 것으로 산화와 염증의 밀접한 연관성을 잘 보여주고 있다고 할 수 있다.

RAW 2647 세포에 DCM과 EA 추출물을 처리하고, 1시간이 지난 후에 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다.

그리고 염증인자인 NO, PGE₂의 production, iNOS, COX-2 expression, proinflammatory cytokines인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량을 측정하였다. 그 결과, DCM과 EA 추출물-모두 LPS로 유도된-염증 인자들을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고(Fig. 5-7), 그 중에서도 EA 추출물의 효과가 좀 더 우수한 것으로 나타났다.

이러한 실험 결과들로 보아, 혈갈의 획분층 중에서 DCM과 EA 추출물이 뛰어난 항산화 활성을 갖고 있고, 이들은 항염증 활성 역시 우수했다. 그리고 DCM과 EA 추출물 중에서는 EA 추출물이 좀 더 뛰어난 활성을 보였다. 따라서 동맥경화를 비롯한 고혈압, 암, 당뇨, 관절염 등의 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

혈갈 획분층의 항산화 활성과 마우스 대식세포에서의 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈갈 메탄을 추출물을 물과 혼합한 뒤, 차례로 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol과 섞어서 획분층별 추출물을 분리했다.
2. in vitro 상에서 DPPH radical, ROS의 일종인 superoxide anions 그리고 RNS의 일종인 nitric oxide의 소거활성을 추출물 별로 비교한 결과, 세 가지 모두에서 좋은 활성을 보인 것은 DCM과 EA 추출물임을 알 수 있었다.
3. 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 DCM과 EA 추출물의 독성을 조사하여 생존율에 영향을 미치지 않는 농도(60 μ g/ml)에서 실험을 진행하였다. 이는 혈갈 추출물의 항산화 및 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약제들의 고유한 특성임을 말한다.
4. RAW 264.7 세포에 4 mM의 H₂O₂와 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 세포 내 산화를 유도한 결과, DCM과 EA 추출물 모두 농도의존적으로 산화를 막았고, EA 추출물에서 좀 더 우수한 방어 효과를 보였다. 이는 in vitro 상의 항산화 활성이 세포에서도 적용됨을 의미한다.
5. RAW 264.7 세포에 약제를 1시간 전 처리한 후, 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그 결과 DCM과 EA 추출물이 LPS로 유도되는

NO, PGE₂의 생성량과 iNOS, COX-2의 발현을 크게 저해하였고, 또한 염증성 사이토카인도 현저히 감소시켰다. 그 중에서도 EA 추출물의 효과가 좀 더 우수했다.

이러한 실험 결과들로 보아, 혈갈의 DCM과 EA 추출물은 뛰어난 항산화 효과 및 항염증 효과를 가지고 있으며, 이는 동맥경화를 비롯한 고혈압, 암, 당뇨나 관절염 등 만성 염증성 질환(chronic inflammatory disease)의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초과학연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음(과제번호 : R13-2005-013-01000-0)

본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비로 이루어진 논문임

참고문헌

1. 김창민 외. 完譯 中藥大辭典, 서울 : 도서출판 정담. 1997 : 4795-6.
2. Lu H, Teng J, Wu H. A review on the study of Resina Draconis produced in China. Zhong Yao Cai. 2003 ; 26 : 459-61.
3. Edwards HGM, Oliveira LFC, Prendergast HDV. Raman spectroscopic analysis of dragon's blood resins-basis for distinguishing between *Dracaena* (Convallariaceae), *Daemonorops* (Palmae) and *Croton* (Euphorbiaceae). Analyst. 2004 ; 129 : 134-8.
4. Mitscher LA, Leu RP, Bathala MS, Wu WN, Beal JL, White R. Antibicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. Lloydia. 1972 ; 35 : 157-66.
5. Rao GSR, Gehart MA, Lee III RT, Mitscher LA, Drake S. Antimicrobial agents from higher plants: Dragon's blood resin. J Nat Prod. 1982 ; 45 : 646-8.
6. Xia M, Wang M, Tashiro SI, Onodera S, Minami M, Ikejima T. Dracorhodin perchlorate

induces apoptosis via activation of caspases and generation of reactive oxygen species. *J Pharmacol Sci.* 2004 ; 95 : 273-83.

7. Xia M, Wang M, Tashiro SI, Onodera S, Minami M, Ikejima T. Dracorhodin perchlorate induces A375-S2 cell apoptosis via accumulation of p53 and activation of caspases. *Biol Pharm Bull.* 2005 ; 28 : 226-32.

8. Xia MY, Wang MW, Cui Z, Tashiro SI, Onodera S, Minami M, Ikejima T. Dracorhodin perchlorate induces apoptosis in HL-60 cells. *J Asian Nat Prod Res.* 2006 ; 8 : 335-43.

9. Xia MY, Wang MW, Wang HR, Tashiro S, Ikejima T. Mechanism of dracorhodin perchlorate-induced Hela cell apoptosis. *Yao Xue Xue Bao.* 2004 ; 39 : 966-70.

10. Tsai WJ, Hsieh HT, Chen CC, Chen CF. Studies on the vasoactive-antithrombotic effect of Draconis Resina and its components. *Chin Med.* 1995 ; 6 : 59-73.

11. Tsai WJ, Hsieh HT, Chen CC, Chen CF, Kuo YC, Chen CF. Characterization of the antiplatelet effects of (2s)-5-methoxy-6-methylflavan-7-ol from Draconis Resina. *Eur J Pharmacol.* 1998 ; 346 : 103-10.

12. Choy CS, Hu CM, Chiu WT, Lam CS, Ting Y, Tsai SH, Wang TC. Suppression of lipopolysaccharide-induced of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by Sanguis Draconis, a dragon's blood resin, in RAW 2647 cells. *J Ethnopharmacol.* 2008 ; 115(3) : 455-62.

13. Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand.* 1998 ; 98 : 145-53.

14. Brune B, Zhou J, Von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl.* 2003 ; 84 : 22-4.

15. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2008 ; 11(1) : 11-5.

16. Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim J. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase

(iNOS) gene expression by blocking NF-kappa B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells.* 2007 ; 23(3) : 398-404.

17. Nishida T, Yabe Y, Fu HY, Hayashi Y, Asahi K, Eguchi H, Tsuji S, Tsujii M, Hayashi N, Kawano S. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF-kappaB. *Dig Dis Sci.* 2007 ; 52(8) : 1890-6.

18. Lin YL, Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol.* 1997 ; 52(3) : 465-72.

19. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol.* 1999 ; 126(3) : 673-80.

20. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 1999 ; 20(10) : 1945-52.

21. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. *Gen Pharmacol.* 1999 ; 32 : 661-7.

22. Gotoh N, Niki E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochim Biophys Acta.* 1992 ; 1115 : 201-7.

23. Sutherland H, Khundkar R, Zolle O, McArdle A, Simpson AW, Jarvis JC, Salmons S. A fluorescence-based method for measuring nitric oxide in extracts of skeletal muscle. *Nitric Oxide.* 2001 ; 5 : 475-81.

24. Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci.* [Epub ahead of print], 2007.

25. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999 ; 27 :

612-6.

26. Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginko biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1996 ; 20 : 121-7.

27. Wang S, Chen Y, He D, He L, Yang Y, Chen J, Wang X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with Gastrodia and Uncaria decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 114(3) : 458-62.

28. 유형준. 動脈硬化. 한국논문단(Monthly Korea Forum). 2001 ; 142(1) : 166-9.

29. 한기훈. 이상지질혈증, 염증과 죽상동맥경화. 심장관 혈관(Cardiovascular Update). 2004 ; 6(3) : 6-13.

30. Collins T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest.* 1993 ; 68(5) : 499-508.

31. Chung IM, Kim KH, Ahn JK. Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. *Kor J Med Sci.* 1998 ; 6 : 311-22.

32. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* 1999 ; 85(8) : 753-66.

33. Kujala TS, Loponen JM, Klika KD, Pihlaja K. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compound. *J Agric Food Chem.* 2000 ; 48 : 5338-42.

34. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Bohm M, Meinertz T, Munzel T. Increased NADH oxidase mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin angiotensin system. *Circulation.* 1999 ; 99 : 2027-33.

35. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells.

Hypertension. 2004 ; 44 : 381-6.

36. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Thrombo Haemost.* 2004 ; 3 : 254-67.

37. Hogg N, Darley Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J.* 1992 ; 281 : 419-24.

38. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 ; 81 : 3883-7.

39. Lee JY, No JK, Soung DY, Kim YJ, Je JH, Kim MS, Lee KH, Chung HY. ROS/RNS scavenging activity of rosmarinic acid. *Kor J Gerontol.* 2005 ; 15(2) : 10-6.

40. Woo CH, Lim JH, Kim JH. Lipopolysaccharide induces matrix metallo proteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J Immunol.* 2004 ; 173(11) : 6973-80.

41. Chung HY, Kim HJ, Shin KH, Kim KW. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech Ageing Dev.* 1999 ; 111(2-3) : 97-106.

42. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 ; 19(7) : 1623-9.

43. Grilli M, Chiu JJ, Leonardo MJ. NF- κ B Rel: participants in a multifactorial transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol.* 1993 ; 143 : 1-62.

44. Ivanov V, Merckenschlager M, Ceredig R. Antioxidant treatment of thymic organ cultures decreases NF- κ B and TCF1(α) transcription factor activities and inhibits alpha beta T cell development. *J Immunol.* 1993 ; 151(9) : 4694-704.