

마우스 대식세포 및 사람 혈관 내피세포에서 오수유(*Evodia officinalis* D_{ODE}) 메탄올 추출물의 항염증 효과

윤현정^{1,2,#}, 허숙경^{1,2}, 이영태², 박원환¹, 박선동^{1,2*}

1: 심혈관계질환 천연물연구개발센터, 2: 동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-inflammatory Effect of *Evodia Officinalis* D_{ODE} in Mouse Macrophage and Human Vascular Endothelial Cells

Hyun-Jeung Yun^{1,2,#}, Sook-Kyoung Heo^{1,2}, Young-Tae Lee², Won-Hwan Park¹,
Sun-Dong Park^{1,2*}

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

ABSTRACT

Objectives : *Evodia officinalis* DODE (EO), an herbal plant, has been widely used in traditional Korean medicine for the treatment of vascular diseases such as hypertension. The crude extract of EO contains phenolic compounds that are effective in protecting liver microsomes, hepatocytes, and erythrocytes against oxidative damage. But EO has been little found to have an anti-inflammatory activity. We investigated anti-inflammatory activity of EO in RAW 264.7 cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Methods : Cytotoxic activity of EO on RAW 264.7 cells was investigated by using 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. The nitric oxide (NO) production was measured by Griess reagent system. And proinflammatory cytokines were measured by ELISA kit. The levels of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression were measured by flow cytometer.

Results : EO decreased LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. The inhibitory activity of EO on LPS-induced NO release is probably associated with suppressing TNF- α , IL-6 and MCP-1 formation. These results indicate that EO has potential as an anti-inflammatory agent. Moreover, EO decreased TNF- α -induced IL-8, IL-6 production, and ICAM-1 and VCAM-1 expression in HUVECs.

Conclusions : EO inhibits TNF- α -induced inflammation via decreasing cytokines production and adhesion molecules expression. These results indicate that EO has potential as an anti-inflammation and anti-atherosclerosis agent.

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

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

#제1저자 : 윤현정, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실

· Tel : 054-770-2654 · E-mail : sksms97@hanmail.net

· 접수 : 2008년 1월 31일 · 수정 : 2008년 3월 12일 · 채택 : 2008년 3월 17일

Key words : *Evodia officinalis* DODE, anti-inflammatory activity, cytokine, adhesion molecule

서론

오수유는 운향과(Rutaceae)에 속한 오수유 (*Evodia officinalis* DODE)의 성숙한 과실을 건조한 것이다. 한방에서는 열매를 오수유(*Evodiae Fructus*)라고 하며 건위(健胃), 진통(鎮痛), 온중(溫中) 및 이기(理氣)의 작용을 가지고 吳茱萸湯, 茱連丸 그리고 左金丸 등의 처방에서 主藥으로 사용되어 왔다¹⁾. 오수유는 alkaloids를 함유하며 evodiamine, hydroxy-evodiamine, rutaecarpine, evocarpine, hydroxyevocarpine, isoevodiamine, higenamine 등이 있고, 정유가 약 2%로 evodene, ocimene 등이 존재하고, 고미성분으로 limonin, rutaevine 등 비고미성분으로 evodol 등을 함유하고 있다. 지금까지 알려진 약리 작용으로는 심혈관계에서 혈압을 강하시키고, 말초혈관을 확장시키며 아울러 항혈전 작용이 보고되었다. 한편 소화기계에서는 방향성 건위 작용과 제토 작용, 항궤양 작용이 있음이 알려졌다. 또한 진통작용의 유효성분은 evodiamine, rutaecarpine, isoevodiamine, evodol 등이 알려졌으며, 이외에도 중추신경 흥분 작용과 체온상승 작용, 자궁수축 작용 및 기관지확장 작용도 있다^{2,3)}.

염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, prostaglandin E₂(PGE₂), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. 특히 대식세포에서 cytokines, tumor necrosis factor(TNF- α), lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)를 활성화시키며 그 결과 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)를 발현시켜 과량의 nitric oxide(NO)와 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다^{4,5)}.

최근 혈관질환으로 혈관에서의 염증반응에 대한 관심이 높아지고 있다. 혈관은 내피세포와 평활근세포로 대부분 이루어져 있는데, 혈관 내의 염증기작에서 특이한 것은 부착분자인 intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) 등의 과발현이 관찰된다. 따라서 이러한 염증기작에 의한 혈관의 손상이 각종 동맥경화증이나 심부전과 같은 질환에 결정적 요인이 될 수 있다^{6,7)}.

본 연구에서는 마우스 대식세포와 사람 혈관의 내피세포에 대한 오수유 메탄올추출물의 항염증 활성을 조

사하였다. 그 지표로서 proinflammatory cytokine인 interleukin-8(IL-8), interleukin-6(IL-6), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)의 생성량과 세포의 유주에 관여하는 부착분자인 ICAM-1, VCAM-1의 발현 정도를 관찰하였다. 그리고 세포가 방출하는 NO와 iNOS의 발현양상을 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학교실에서 선별하고 정선한 것을 사용하였으며, 300 g의 오수유에 3배량의 100% methanol을 넣은 다음 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 23.7 g(수율 : 7.9%)을 얻었다. 이렇게 얻은 오수유 분말을 배양액에 녹여 실험에 사용하였다.

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, Endothelial cell Growth Medium-2(EGM-2)는 ScienCell사(Sandiego, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodecyl sulfate(SDS), acrylamide, bis는 Bio-Rad사(Hercules, USA)에서 구입하였고, NP-40, 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, USA)에서, beta-actin mAb는 Cell Signaling Technology사(Beverly, USA)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 Promega사(Madison,

USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정을 위한 ELISA kit는 Pierce Biotechnology사(Rockford, USA)에서 구입하였으며, Protein assay reagent는 Bio-Rad사(Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, 세포 배양을 위하여 10% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 사람의 제대정맥 내피세포주인 Human Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVEC)는 ScienCell사(Sandiego, CA)에서 분양받았다. 각각의 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) MTS assay

오수유의 메탄올 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay⁸⁾ 방법으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10⁴/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 오수유 메탄올추출물을 농도별(0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml)로 18시간 동안 처리하였다. Well당 20 µl의 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 오수유 메탄올추출물이 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

3) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 수행하였다. 세포에 오수유의 메탄올추출물을 농도별로 처리하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하였다. 18-24시간 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한

후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50µl씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100µl의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100µl의 streptavidine-HRP solution을 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2, 4, 5-trimethoxybenzalmalonate(TMB) 기질을 100µl씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess reagent system⁹⁾을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 오수유의 메탄올추출물을 전처리 하고 1시간 후 100 ng/ml의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 배양액 50 µl와 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.

5) 유세포 분석기를 이용한 부착분자 발현을 측정

HUVEC 세포에 100 ng/ml의 TNF-α와 오수유의 메탄올추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양 후 세포를 회수하여 FACS buffer(0.2% BSA-PBS)로 2회 세척하였다. 각각의 sample에 PE anti-human ICAM-1 mAb 및 PE anti-human VCAM-1 mAb (Pharmingen, Sandiego, USA)을 1 µl씩 첨가하여 Vortex Mixer로 섞어준 다음 암실에서 30분간 반응시킨 후 FACS buffer로 2회 세척하였다. 500 µl의 FACS buffer를 가하여 Vortex Mixer로 잘 섞어 준 후 유세포 분석기(Becton Dickinson, USA)로 분석¹⁰⁾하였다.

6) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 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 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상층액

을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 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 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

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. 오수유 메탄올추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

오수유 메탄올추출물이 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 세포 독성을 갖는지 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 그 결과, 500 µg/ml의 농도까지 세포의 생존율에 크게 영향을 주지 않았고 700 µg/ml의 농도에서 약 63.1%까지 생존율을 감소시켰다(Fig. 1).

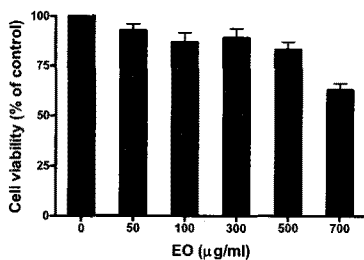


Fig. 1. Effect of EO on the cell viability of RAW 264.7 cells using MTS assay

RAW 264.7 cells(1×10⁴ cells/plate) were treated with various concentrations (0, 50, 100, 300, 500, 700 µg/ml) of EO for 18 h. Cell viability was measured by MTS assay as described in materials and methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

2. RAW 264.7 세포에서 오수유 메탄올추출물이 LPS로 유도된 proinflammatory cytokines의 생성에 미치는 영향

먼저 RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별(0, 1, 10, 100 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 후 proinflammatory cytokines의 생성을 유도하는 지 알아보았다. 그 결과 LPS의 농도에 의존적으로 생성량이 증가되었다. 100 ng/ml의 농도에서 TNF-α는 약 4.3배 증가되었고 IL-6, MCP-1은 각각 57.3, 5.2배 증가되었다(Fig. 2).

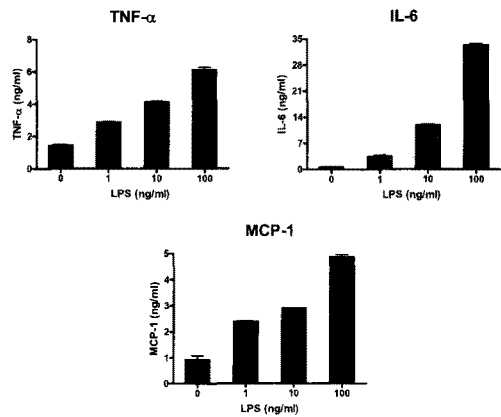


Fig. 2. LPS-induced proinflammatory cytokines in RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 1, 10, 100 ng/ml) of LPS for 18 h. The levels of cytokines production were measured by using ELISA kits. Data are represented as mean±SEM.

1) TNF-α 생성량에 미치는 영향

오수유 메탄올추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 처리하여 오수유 메탄올추출물이 LPS에 의해 유도되는 TNF-α의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 50, 100, 300, 500 µg/ml의 농도에서 각각 1.80, 3.88, 17.20, 20.20%까지 감소시켰다(Fig. 3).

2) IL-6 생성량에 미치는 영향

오수유 메탄올추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 처리하여 오수유 메탄올추출물이 LPS에 의해 유도되는 IL-6의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 500 µg/ml의 농도에서 각각 22.17%까지 감소시켰다(Fig. 4).

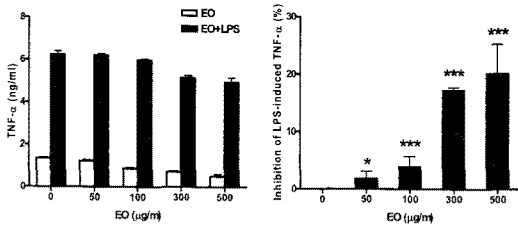


Fig. 3. Inhibition of LPS-induced TNF-α by EO

RAW 264.7 cells were treated with LPS(100 ng/ml) and various concentrations of EO(0, 50, 100, 300, 500 μg/ml) for 18 h. The TNF-α levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means±SEM. * : P value < 0.05, *** : P value < 0.001

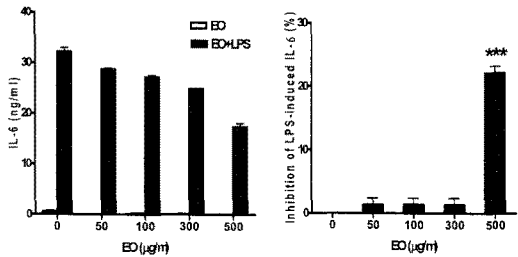


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced IL-6 by EO

RAW 264.7 cells were treated with LPS(100 ng/ml) and various concentrations of EO(0, 50, 100, 300, 500 μg/ml) for 18 h. The IL-6 levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means±SEM. *** : P value < 0.001

3) MCP-1 생성량에 미치는 영향

오수유 메탄올추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리 한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 처리하여오수유 메탄올 추출물이 LPS에 의해 유도되는 MCP-1의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 50, 100, 300, 500 μg/ml의 농도

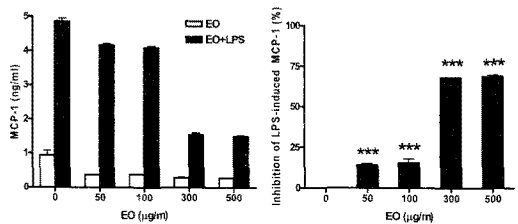


Fig. 5. Inhibition of LPS-induced MCP-1 by EO

RAW 264.7 cells were treated with LPS(100 ng/ml) and various concentrations of EO(0, 50, 100, 300, 500 μg/ml) for 18 h. The MCP-1 levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means±SEM. *** : P value < 0.001

에서 각각 14.09, 15.42, 68.07, 69.03%까지 감소시켰다 (Fig. 5)

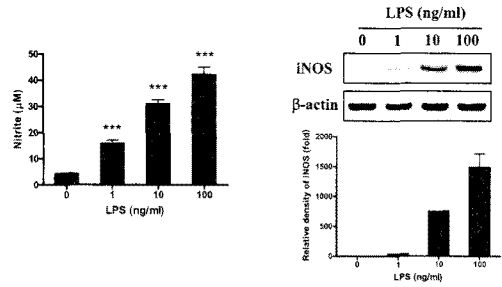


Fig. 6. LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were treated with LPS (100 ng/ml). The nitric oxide production was measured by Griess Reagent System. The expression levels of iNOS were determined by western blotting. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 7.5% SDS-PAGE. b-actin levels were used as internal markers for loading variation. Data are represented as means±SEM. *** : P value < 0.001

3. RAW 264.7 세포에서 오수유 메탄올추출물이 LPS로 유도된 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

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, 100 ng/ml의 농도에서 약 9.6배 증가되었다. 또한 NO를 합성하는 효소인 iNOS의 발현도 LPS의 농도에 의존적으로 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 오수유 메탄올추출물을 농도별로 1시간 동안 전처리 한 후 100 ng/ml LPS를 18시간 처리하여 LPS에 의해 유도되는 NO와 iNOS에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. 그 결과 NO의 경우 오수유 메탄올추출물의 농도 50, 100, 300, 500 μg/ml에서 각각 28.64, 49.64, 94.68,

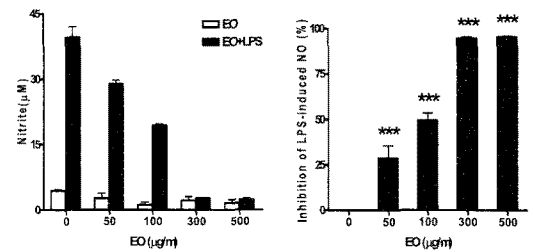


Fig. 7. Inhibition of LPS-induced NO production by EO

RAW 264.7 cells were treated with LPS (100 ng/ml) and various concentrations of EO (0, 50, 100, 300, 500 μg/ml) for 18 h. The nitric oxide production was measured by Griess Reagent System. Data are represented as means±SEM. *** : P value < 0.001

95.36%까지 생성율이 감소되었고(Fig. 7) iNOS의 발현도 오수유 메탄올추출물의 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 8).

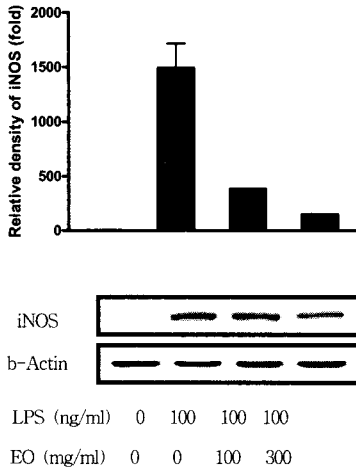


Fig. 8. Inhibition of LPS-induced iNOS expression by EO in RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were treated with LPS(100 ng/ml) and various concentrations of EO(0, 100, 300 µg/ml) for 18 h. The nitric oxide production was measured by Griess Reagent System. The expression levels of iNOS were determined by western blotting. Equal protein of the total cell lysates were analyzed by 7.5% SDS-PAGE. b-actin levels were used as internal markers for loading variation. Data are represented as means±SEM.

4. 사람의 혈관내피세포에서 오수유 메탄올추출물이 TNF-α로 유도된 proinflammatory cytokines 생성에 미치는 영향

HUVEC에 100 ng/ml TNF-α와 오수유 메탄올추출물 농도별(0, 50, 100, 300, 500 µg/ml)로 24시간 동안 처리하여 proinflammatory cytokines 생성에 어떠한 변화가 있는지 조사하였다. Fig. 9에 보듯이, TNF-α로 유도된 IL-8은 오수유 메탄올추출물의 농도 50, 100, 300, 500 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각각 10.85, 17.46, 52.97, 85.78%까지 감소되었다. 또한, TNF-α로 유도된 IL-6도 오수유 메탄올추출물의 농도 50, 100, 300, 500 µg/ml의 농도에서 각각 31.32, 48.40, 66.46, 67.75%까지 감소되는 것을 확인하였다.

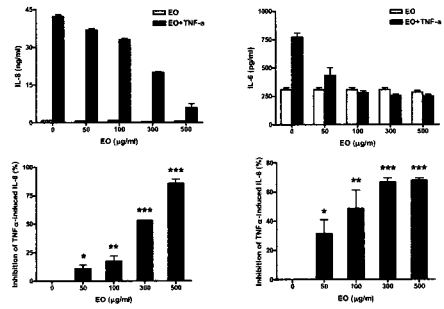


Fig. 9. Inhibition of TNF-α-induced IL-8 and IL-6 production by EO in HUVEC

Cells were treated with TNF-α (100 ng/ml) and various concentrations of EO (0, 50, 100, 300, 500 µg/ml) for 24 h. The cytokine levels were measured by using ELISA kit. Data are represented as means±SEM. * : P value < 0.05, ** : P value < 0.01, *** : P value < 0.001

5. 사람의 혈관내피세포에서 오수유 메탄올추출물이 TNF-α로 유도된 부착분자의 발현에 미치는 영향

HUVEC 세포에 100 ng/ml TNF-α와 오수유 메탄올추출물 농도별(0, 50, 100, 300, 500 µg/ml)로 24시간 동안 처리하여 부착분자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 10에 보듯이, TNF-α에 의해 증가된 ICAM-1의 발현이 오수유 메탄올추출물의 농도 50, 100, 300, 500 µg/ml에서 각각 21.0, 54.2, 71.3, 73.0%까지 감소되었다. TNF-α에 의해 유도되는 VCAM-1의 발현도 각각 41.2, 81.1, 81.0, 80.8%까지 감소되었다. 이로써 오수유 메탄올추출물에 의해 부착분자의 발현이 효과적으로 감소됨을 확인할 수 있었다.

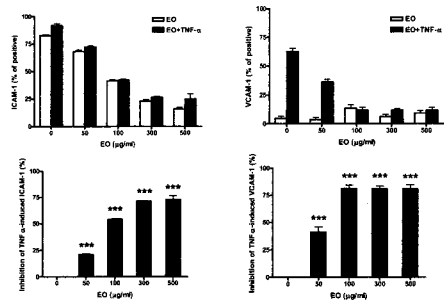


Fig. 10. Inhibition of TNF-α-induced ICAM-1 (A) and VCAM-1 (B) expression by EO in HUVEC

Cells were treated with TNF-α(100 ng/ml) and various concentrations of EO(0, 50, 100, 300, 500 µg/ml) for 24 h. The expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 were measured by flow cytometer. Data are represented as means±SEM. *** : P value < 0.001

고 찰

동맥의 벽은 세 개의 층으로 되어 있다. 제일 안쪽이 얇은 단층의 세포(endothelial cells)로 된 내막(intima)이며, 중간층(media)은 평활근세포(smooth muscle cells)로 된 비교적 두꺼운 층으로서 동맥벽의 탄력성은 이 근육층에 있으며, 제일 바깥쪽은 외막(externa)으로서 동맥을 보호하는 역할을 한다.¹¹⁾ 동맥경화가 유발되는 과정을 살펴보면, 동맥 내막에 물리적 또는 생물학적 손상이 반복하여 가해지면 내막층이 갈라지거나 얇아져서 혈액 속의 단핵구, 임파구 등의 세포들이 내막의 틈을 비집고 들어가서 내막 아래에 자리 잡게 된다. 이 세포들은 일단 조직에 들어가게 되면 지방분을 탐식하여 세포질 속에 많은 지방을 함유하게 됨과 동시에 증식인자를 분비하여 평활근 세포와 결합조직세포가 증식을 일으키게 만들어서 동맥벽이 두꺼워지며, 한편으로는 내막마저도 동맥 내강 쪽으로 두드러져 오르게 된다. 동맥내막이 이런 변화를 가져오면 혈액 속의 혈소판들이 내벽에 침착되어 역시 증식인자를 분비하여 그 근처의 세포를 증식시켜서 끝내는 기름을 많이 포함한 거품세포(foam cells)를 형성하게 된다. 이들이 다시 증식인자를 분비하여 죽종을 형성하여 동맥내강으로 올라와서 혈류의 장애를 일으키게 된다.^{12,13)}

동맥경화는 고지혈증이나 고혈압, 흡연, 당뇨, 비만 등에 의해 유발되는 질병으로 혈관 내에 지방이 축적되어 혈관이 좁아져 혈액의 이동이 원활하지 못하게 된다. 이로써 협심증 등의 질병의 원인이 되는데, 이는 약물치료와 혈관확장술, 심장혈관 수술 등의 방법으로 치료를 하게 된다. 이들 중 최근 널리 이용되는 것이 관상동맥 풍선 확장술로서, 좁아진 혈관에 풍선을 넣어 물리적으로 혈관을 확장시켜주는 방법이다. 그러나 이러한 혈관 확장 수술의 문제점은 수술 후 회복 과정 중에 나타나는 염증 반응에 의해 재협착이 생기고 이로 인해 질병이 재발하는 것이다.^{14,15)} 따라서 이러한 염증을 억제하는 것이 중요하다. 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(pro-inflammatory mediators)이 만들어지는데 이로 인하여 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타난다. 염증인자에는 iNOS에 의해서 만들어지는 NO와 COX-2에 의해서 만들어지는 PGE₂ 등이 있다. 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE₂를 생성하

여 염증을 일으킨다.^{19,20)} 포유동물 세포의 NOS의 경우, 유사형태가 3가지 존재하는데 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), 그리고 iNOS이다. 그 중에서 특히 iNOS가 염증반응에 관여한다. nNOS와 eNOS는 항상 발현되어있으며, iNOS의 경우 interferon- γ , LPS, 그리고 여러 가지 염증성 사이토카인의 자극 있을 때 발현된다. 보통 eNOS는 강력한 혈관확장제로서 혈관의 항상성(vascular homeostasis) 유지에 중요한 역할을 한다. 또한 NO는 급성, 만성 염증반응을 조절하기도 한다. PGE₂는 COX에 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, PGE₂의 생산은 면역세포의 대표적인 염증인자이다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 등이 포함된다. 이에 본 연구에서는 오수유 메탄올추출물이 마우스대식세포주인 RAW 264.7과 사람 혈관 내피세포주인 HUVEC에서 염증을 조절할 수 있는지 알아보았다.

실험에 사용된 오수유는 낙엽 소교목으로서, 주로 경주지방에서 자생되고 있으며, 높이가 5m에 달하고 어린 가지에 털이 있다. 한방에서는 건위(健胃), 구풍(驅風), 해독(解毒) 및 이뇨제(利尿劑)로 사용한다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 현대약리작용을 살펴보면, 심혈관계에 대한 작용으로 혈압을 강하시키고 말초혈관을 확장시키는 작용이 있으며, 혈류를 촉진시키며 항혈전 작용도 있다. 소화기계에 대한 작용으로는 방향성건위 작용과 제토 작용, 항궤양 작용, 그리고 장에 대해서는 소장일 경우는 흥분작용을 나타내고 대장인 경우는 수축억제작용을 나타낸다. 진통작용의 유효성분은 evodiamine, rutaecarpine, isoevodiamine, evodol 등이 알려져 있고, 항균작용과 구충작용도 있다. 응용방제로는 온경탕, 오수유탕, 당귀사역가오수유생강탕, 오미자산 등이 있다.¹⁹⁾

최근 발표된 연구결과를 보면, Choi²⁰⁾는 오수유의 주요 성분이 세포에 작용하는 항염증기전을 밝혔는데 evodiamine과 rutaecarpine의 경우, RAW264.7세포에서 LPS로 유도된 prostaglandin E₂의 합성을 효과적으로 억제하였고, 특히 evodiamine은 COX-2 유도와

NF-kappaB 활성을 저해하였으며, $Ko^{21)}$ 는 neutrophils 과 microglial세포에서 항염증효과와 그 기전을 확인하였다. Yarosh²²⁾는 피부에서의 항염증활성이 있다고 주장하였다. 또한 Adams²³⁾는 오수유의 quinolone alkaloids가 염증물질인 leukotriene의 생합성을 억제한다고 하였다. 그 밖에도 많은 연구에서 오수유 및 그 주요 성분의 항염증 활성에 관해 보고 되고 있다²⁴⁾. 그리고 몇몇 보고에 의하면 evodiamine이 사람의 여러 암세포주에서 apoptosis를 유도함으로써 항암활성을 가지고 있다고 알려져 있다²⁵⁻²⁷⁾.

본 연구에서는 오수유 메탄올추출물의 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식 세포주인 RAW 264.7과 사람 혈관 내피 세포주인 HUVEC에 오수유 메탄올추출물을 농도별로 처리하여 실험을 수행하였다. 먼저, MTS assay를 수행한 결과, 오수유 메탄올추출물의 적정농도 범위 내에서는 RAW 264.7의 세포 생존율에 크게 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. 다음으로, RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별(0, 1, 10, 100 ng/ml)로 18시간 동안 처리한 후 proinflammatory cytokines의 생성을 유도하는 지 알아보았다. 그 결과 LPS의 농도에 의존적으로 TNF- α , IL-6, MCP-1의 생성량이 증가되었고, 100 ng/ml의 농도에서 가장 큰 효과를 나타내었다. 따라서 100 ng/ml의 LPS와 오수유 메탄올추출물을 농도별로 처리하여 각각의 cytokines의 생성량에 어떠한 영향을 주는 지 알아보았다. 그 결과 오수유 메탄올추출물의 농도에 의존적으로 TNF- α , IL-6, MCP-1의 생성량이 감소하였다. 또한 LPS 처리시 NO의 생성량이 농도 의존적으로 증가되었으며, 100 ng/ml의 농도에서 약 9.6배 증가되었다. 또한 NO를 합성하는 효소인 iNOS의 발현도 LPS의 농도에 의존적으로 크게 증가하였다. LPS로 유도된 NO 생성과 iNOS의 발현이 오수유 메탄올추출물을 처리함으로써 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 실험 결과들로 보아, proinflammatory cytokines 및 NO의 생성과 iNOS의 발현을 조절함으로써 항염증 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

다음으로 HUVEC에 대해서도 이러한 항염증 활성을 갖는지 알아보았다. 세포에 100 ng/ml TNF- α 와 오수유 메탄올추출물을 농도별(0, 50, 100, 300, 500, 700 μ g/ml)로 24시간 동안 처리한 결과, TNF- α 에 의해 유도된 proinflammatory cytokine인 IL-8, IL-6가 오수유 메탄올추출물의 농도에 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 TNF- α 에 의해 유도된 부착분자의 발현을 조사한 결과, 오수유 메탄

올추출물의 농도에 의존적으로 ICAM-1, VCAM-1의 발현이 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

이러한 실험결과들로 보아, 오수유 메탄올추출물이 동맥경화와 같은 염증성 질환의 치료에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

1. 오수유 메탄올추출물이 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 세포 독성을 갖는지 조사한 결과 세포 생존율에는 크게 영향을 주지 않았다.

2. RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별로 처리한 결과, proinflammatory cytokine인 TNF- α , IL-6, MCP-1의 생성량이 증가되었고, LPS에 의해 유도된 proinflammatory cytokines는 오수유 메탄올추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되었다.

3. RAW 264.7 세포에 LPS를 농도별로 처리한 결과, NO의 생성량과 iNOS의 발현이 크게 증가하였고, LPS로 유도된 NO와 iNOS는 함께 처리한 오수유 메탄올추출물의 농도에 의존적으로 감소되었다.

4. 사람의 혈관내피세포인 HUVEC에서 오수유 메탄올추출물이 TNF- α 로 유도된 proinflammatory cytokines인 IL-8과 IL-6의 생성을 감소시켰다.

5. 오수유 메탄올추출물이 TNF- α 로 유도된 부착분자의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, TNF- α 에 의해 유도되는 ICAM-1과 VCAM-1의 발현이 오수유 메탄올추출물의 농도에 의존적으로 감소되었다.

이러한 실험 결과로 보아, 오수유 메탄올추출물은 항염증 효과를 가지고 있으며, 혈관내의 염증기작으로 인한 동맥경화증이나 심부전과 같은 질환의 치료에 효과적으로 작용할 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. 金在佶. 원색천연약물대사전(상권). 서울 : 도서출판 남산당. 1984 : 353.
2. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 255, 2004.
3. 曾野維喜, 續東西醫學臨床漢方處方學, 일본, 남산당. pp113-115, 1995.
4. 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-kappaB transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells*. 2007 ; 30 ; 23(3) : 398-404.
5. 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) : 1890-1896.
6. Mes Bouhleb MA, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Peroxisome proliferator-activated receptors-from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease. *J Intern Med*. 2007 ; 27 ; [Epub ahead of print].
7. Li JJ, Zhu CG, Yu B, Liu YX, Yu MY. The role of inflammation in coronary artery calcification. *Ageing Res Rev*. 2007 ; 6(4) : 263-270.
8. Desai A, Vyas T, Arijji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci*. 2007 ; 13 ; [Epub ahead of print].
9. 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 ; 3 ; 114(3) : 458-462.
10. Chen PL, Easton A. Apoptotic Phenotype Alters the Capacity of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand to Induce Human Vascular Endothelial Activation. *J Vasc Res*. 2007 ; 16 ; 45(2) : 111-122.
11. Depré C, Ribichini F, Wijns W. Morphological analysis of atherosclerotic plaque retrieved by coronary atherectomy. *Semin Interv Cardiol*. 2000 ; 5(4) : 175-184.
12. Doyle B, Caplice N. Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007 ; 29 ; 49(21) : 2073-2080.
13. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness : a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007 ; 30 ; 115(4) : 459-467.
14. Zubilewicz T, Wronski J, Bouriez A, Terlecki P, Guinault AM, Muscatelli-Groux B, Michalak J, Mélière D, Becquemin JP, Allaire E. Injury in vascular surgery—the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit*. 2001 ; 7(2) : 316-324.
15. Meyers PM, Schumacher HC, Tanji K, Higashida RT, Caplan LR. Use of stents to treat intracranial cerebrovascular disease. *Annu Rev Med*. 2007 ; 58 : 107-122.
16. Chung BS. Studies on the Components of *Evodia daniellii* Hemsley in Korea. *Kor J Pharmacog*. 1970 ; 1(4) : 119-124.
17. 한국약학대학협의회 약전분과회 : 대한약전 제7개정. 서울 : 문성사. 1998 : 1079.
18. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해서. 서울 : 한국메디칼인덱스사. 1988 ; 575-576.
19. 曾野維喜. 續東西醫學臨床漢方處方學. 일본. 남산당. 1995 : 113-115.
20. Choi YH, Shin EM, Kim YS, Cai XF, Lee JJ, Kim HP. Anti-inflammatory principles from the fruits of *Evodia rutaecarpa* and their cellular action mechanisms. *Arch Pharm Res*. 2006 ; 29(4) : 293-297.
21. Ko HC, Wang YH, Liou KT, Chen CM, Chen CH, Wang WY, Chang S, Hou YC, Chen KT, Chen CF, Shen YC. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. *Eur J Pharmacol*. 2007 ; 555(2-3) : 211-217.
22. Yarosh DB, Galvin JW, Nay SL, Peña AV, Canning MT, Brown DA. Anti-inflammatory activity in skin by biomimetic of *Evodia rutaecarpa* extract from traditional Chinese medicine. *J Dermatol Sci*. 2006 ; 42(1) : 13-21.

23. Adams M, Kunert O, Haslinger E, Bauer R. Inhibition of leukotriene biosynthesis by quinolone alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* 2004 ; 70(10) : 904-8.
24. Shin YW, Bae EA, Cai XF, Lee JJ, Kim DH. In vitro and in vivo antiallergic effect of the fructus of *Evodia rutaecarpa* and its constituents. *Biol Pharm Bull.* 2007 ; 30(1) : 197-199.
25. Lee TJ, Kim EJ, Kim S, Jung EM, Park JW, Jeong SH, Park SE, Yoo YH, Kwon TK. Caspase-dependent and caspase-independent apoptosis induced by evodiamine in human leukemic U937 cells. *Mol Cancer Ther.* 2006 ; 5(9) : 2398-2407.
26. Ogasawara M, Suzuki H. Inhibition by evodiamine of hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of tumor cells. *Biol Pharm Bull.* 2004 ; 27(4) : 578-582.
27. 이성우 외. 약용식물 오수유로부터 다약제 내성 조절물질의 분리. *생약학회지.* 1995 ; 26(4) : 344-3485.