

울금과 강황의 항산화 및 항염증 활성 비교연구

오혜인^{1#}, 박한별^{1#}, 주미선², 정선용³, 오명숙^{1,2*}

1: 경희대학교 약학대학 나노의약생명과학과 2: 경희대학교 약학대학 한약학과
3: 경희대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Comparative Study of Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities between Curcuma longae Radix and Curcuma longae Rhizoma

Hyein Oh^{1#}, Hanbyeol Park^{1#}, Mi Sun Ju², Sun-Yong Jung³, Myung Sook Oh^{1,2*}

1: Dept. of Life and Nanopharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University
2: Dept. of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University
3: Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we compared the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Curcuma longae Radix (CLRa) and Curcuma longae Rhizoma (CLRh).

Methods : We performed 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) cation scavenging assays, and determined total polyphenolic content to examine the anti-oxidant effects of CLRa and CLRh. We also evaluated the anti-oxidant effects of CLRa and CLRh against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced toxicity in PC12 cells using thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) and reactive oxygen species (ROS) assays. Next, to compare the anti-inflammatory effects of CLRa and CLRh against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in microglia BV2 cells, we measured nitric oxide (NO) assay and inducible nitrite synthase (iNOS) using Western blotting analysis.

Results : CLRa showed higher activity in DPPH and ABTS assays and lower total polyphenolic contents compared with CLRh. In PC12 cells, CLRa and CLRh showed no difference in H₂O₂-induced cell toxicity and ROS overproduction. In BV2 cells, CLRa showed higher effect than CLRh in NO and iNOS production induced by LPS.

Conclusions : These results demonstrate that CLRa has higher radical scavenging activities and anti-inflammatory effect in BV2 cells comparing CLRh. However, CLRa and CLRh have no effect and no difference in H₂O₂-induced toxicity.

Key words : Curcuma longae Radix, Curcuma longae Rhizoma, anti-oxidant, anti-inflammatory, hydrogen peroxide, lipopolysaccharide

서 론

鬱金과 薑黃은 <<대한약전>>(KP)에 수록되어 있는 약재로 生薑과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 본초인 강

황(薑黃)*Curcuma longa* L.을 약용으로 한다¹⁾. 울금(Curcuma longae Radix)은 강황의 덩이뿌리를 그대로 또는 주피를 제거하고 썬서 말린 것을, 강황(Curcuma longae Rhizoma)은 *C. longa* L.의 뿌리줄기를 약용으로 한다¹⁾.

* 교신저자 : 오명숙, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 약학대학 한약학과 본초학교실

제 1 저자로서 논문의 기여도가 동일함.

· Tel : 02-961-9436 · E-mail : msohok@khu.ac.kr

· 접수 : 2010년 2월 25일 · 수정 : 2010년 3월 17일 · 채택 : 2010년 3월 22일

형태학적으로 강황의 덩이뿌리(塊根)를 사용하는 울금은 방추형으로 양끝이 뾰족한 형태를 가지며 바깥면은 회갈색 혹은 회황색이고 단면은 등황색을 띠며 질은 매우 단단하다. 반면 뿌리줄기(根莖)를 약용으로 하는 강황은 고르지 않은 난원형~원주형 또는 방추형이고 대개는 구부러져 있고 분지를 띠는 것이 많으며, 바깥면은 짙은 황색으로 거칠며 둥근 가지줄기와 수염뿌리의 자국이 있는 등의 울금과 형태학적인 차이점을 가지고 있다²⁾.

울금과 강황이 함유하고 있는 성분으로는 turmerone, zingiberene, phellandrene, 1, 8-cineole, sabinene, borneol 등의 정유성분과 황색색소 성분인 curcumin, coumaroyl, 그리고 ar-turmerone, caryophyllene, curlone, 백당, 과당, 포도당, 전분, 지방유 등이 있다^{3,4)}.

울금과 강황은 본초학적으로 活血祛瘀藥에 속해 있으나 울금의性は寒하고味는辛, 苦하고 活血止痛, 行氣解鬱, 清熱涼血, 清心開竅, 利膽退黃시키는 효능이 있어 氣滯血瘀의 痛症, 血熱瘀滯, 神志不清證, 濕熱黃疸 등을 치료하는 데 반해, 강황의性は溫하며味는辛, 苦하고 破血行氣, 通經止痛의 효능을 가지고 있어 脇痛, 月經腹痛 등을 치료하는 데 사용되어 왔다⁵⁾.

지금까지 울금과 강황이 전통적으로 많이 사용되어 왔고, 이와 함께 울금과 강황이 지닌 여러 가지 효능에 대해 과학적 실험으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 울금에 관한 연구보고는, 닛토균으로 발효한 발효 울금과 울금 에탄올 추출물의 사염화탄소로 간 손상을 일으킨 마우스 및 랫트에서 간 손상 개선효과^{6,7)}, 발효 울금의 고지방 식이로 유도된 마우스에서 혈중 지질 개선효과⁶⁾가 있다. 또한 울금의 추출 조건에 따른 항산화 효과와 미백효과⁸⁾, 울금 물 추출물에서 분리된 anti-oxidant protein (TAP)의 항산화 활성 등이 보고되었고⁹⁾, 80% 메탄올로 추출한 울금이 강제수영검사 등의 행동실험과 혈중 corticosterone의 측정 결과에서 항우울 효과 등이 보고된 바 있다¹⁰⁾. 강황에 관한 연구로는 강황의 물 추출물의 glioma, cervical, prostate cancer 세포에서 항암효과¹¹⁾, 80% 에탄올 강황 추출물의 고환절제 후에 testosterone의 투여로 유발된 전립선비대증에 대한 효과¹²⁾, 고콜레스테롤 식이에 의한 동맥경화증 모델에서 강황 물추출물의 산화스트레스 감소 효과¹³⁾, 그리고 신경아세포(SK-N-MC neuroblastoma cells)에서 과산화수소의 세포사멸에 대한 강황의 보호 작용¹⁴⁾ 등이 보고된 바 있다.

울금과 강황은 기원식물은 같으나 다른 부위를 약용으로 하며, 본초학적으로 울금은 寒한 성질로 清熱, 清心, 行氣解鬱, 涼血消瘀의 효능에 血중의 氣약으로 주로 사용되어 왔고, 강황은 溫한 성질로 밖으로는 寒濕을 제거하고 안으로는 瘀血을 破하는 효능에 보다 많이 사용되어 왔다. 이와 같이 두 약물은 성미와 효능이 달라 본초학적 적용범위가 다름에도 불구하고 실험적으로는 두 약물의 공통 성분인 curcumin 위주의 연구 결과들이 주로 보고

되어 왔으나¹⁵⁻¹⁸⁾, 실제 두 약물 간의 효능 비교에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 울금과 강황 물 추출물의 항산화 및 항염증 활성에 관한 비교 연구를 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 울금(*Curcumae longae Radix*; CLRa)과 강황(*Curcumae longae Rizoma*; CLRh)은 정도 약업사(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 잡질을 제거한 후 10배의 증류수를 가하여 2시간 동안 환류추출한 후 감압 여과(Whatman No. 2)하였다. 여과액을 -60°C 이하에서 얼려 동결건조 하였고(FDU-550R; Eyela Co, Japan), 동결건조 후의 수득율은 각각 4.72, 10.98%였다. -20°C에 보관 후 매 실험 시 용매에 녹여 사용하였다.

2) 시약

세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), Horse serum, penicillin/streptomycin은 Hyclone (Auckland, New Zealand)에서 구입하여 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), potassium persulfate, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS), folin ciocalteu's reagent, tannic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium nitrite, collagen, glycine, phosphoric acid, naphthylethylene diamide, sulfanilamide, sodium chloride, hydrogen peroxide (H₂O₂), lipopolysaccharide (LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), phosphate buffer saline (PBS), trizma base, sodium dodecyl sulfate (SDS), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) 등은 Sigma-Aldrich사(St Louis, CA USA)에서 구입하였다. TEMED, protein standards dual color, western view marker, protein assay, tween 20, protein extraction solution, acrylamide, ammonium persulfate, skim milk, ECL reagent 등은 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)에서 구입하였고, nitrocellulose membrane는 Amersham Bioscience (Pittsburgh, PA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 일차항체인 rabbit anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 Chemicon사(Temecula, USA)에서 구입하였고, Anti-rabbit-horseradish peroxidase (HRP)와 rabbit anti-β-actin 항체는 Assay Designs Inc. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) DPPH radical 소거작용측정

Blois의 방법¹⁹⁾을 응용하여 DPPH free radical에 대한 소거활성을 측정하였다. 0.2 mM DPPH solution 100 μ L와 울금과 강황 추출물 100 μ L를 농도별로 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 spectrophotometer (Versamax microplatereader; Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. DPPH inhibition (%) = {control-(sample-blank)}/control \times 100으로 하였고, half maximal inhibiting concentration (IC₅₀)을 함께 구하였다.

2) ABTS cation 소거작용측정

7.4 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 반응하였다. ABTS+을 형성시키고 PBS로 희석하여 732 nm에서 흡광도 값이 0.70 \pm 0.02이 되게 하였다. 희석된 용액 950 μ L에 울금과 강황 추출물 50 μ L를 가하여 상온에서 5분 동안 방치한 후 spectrophotometer로 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS Inhibition (%) = (control-sample)/control \times 100으로 하였고, IC₅₀을 함께 구하였다.

3) 총 폴리페놀 함량측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법²⁰⁾을 응용하여 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 10 mg/mL 농도의 울금 및 강황 추출물 2 mL와 2 N folin 200 μ L를 혼합하여 3 분간 방치시킨 후 10% Na₂CO₃ 2 mL를 섞은 후 1시간 동안 암실에서 방치시켰다. 반응을 마친 후 spectrophotometer 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀의 표준 곡선은 tannic acid를 사용하였다.

4) PC12 세포에서 H₂O₂에 대한 세포 보호효과측정

(1) 세포배양

Rat의 pheochromocytoma인 PC12 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 10% horse serum, 5% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 high-glucose RPMI1640 배지를 사용하였다.

(2) 세포생존율 측정

96-well plate에 PC12 cell을 3.0 \times 10⁴/well로 분주하고 24시간 후, 울금과 강황 1, 10, 100 μ g/mL 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 약물처리 및 반응 종료 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/mL을 처리하여 2시간 동안 반응시킨 후, DMSO를 이용해 decrystallize시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(3) H₂O₂에 대한 세포보호 효과측정

96-well plate에 PC12 cell을 3.0 \times 10⁴/well로 seeding하

고 37°C의 5% CO₂, 95% air에서 24시간 배양하였다. 울금 및 강황 1, 10, 100 μ g/mL를 1시간 처리 후 H₂O₂(75 μ M)를 23시간 더 처리하였다. 약물과 H₂O₂의 반응 종료 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/mL를 처리하여 2시간 동안 반응시킨 후, DMSO를 이용해 decrystallize시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(4) H₂O₂에 의한 reactive oxygen species 생성에 관한 영향측정

Reactive oxygen species (ROS) 측정은 H₂DCF-DA를 사용해 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 96-well black plate에 PC12 cell을 3.0 \times 10⁴/well로 seeding하고 37°C의 5% CO₂, 95% air에서 24시간 배양하였다. 울금 및 강황 1, 10, 100 μ g/mL를 1시간 전처리하고 H₂O₂ (75 μ M)를 30분간 반응시켰다. 약물과 독성 반응 후 20 μ M H₂DCF-DA를 30분간 반응시키고 fluorescence excitation 495 nm, emission 530 nm로 측정하였다.

5) BV2 세포에서의 LPS에 대한 항염증 효과측정

(1) 세포배양

BV2 세포는 김선여 교수 연구실(Kyung Hee University, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였다.

(2) 세포생존율 측정

96-well plate에 BV2 cell을 2.0 \times 10⁴/well로 분주하고 24시간 후, 울금과 강황 1, 10, 100 μ g/mL 농도별로 24시간 동안 처리하였다. LPS로 유도된 독성에 대한 세포 생존율 측정은 울금과 강황을 1시간 전처리하고 100 ng/mL의 LPS를 23시간 더 처리하였다. 약물처리 및 LPS와 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/mL를 처리하여 2시간 동안 반응시킨 후, DMSO를 이용해 decrystallize시켜 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(3) LPS에 의한 nitric oxide 생성에 관한 영향측정

Nitric oxide (NO)의 농도는 배양액 내의 nitrite농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. BV2 세포에 울금과 강황 1, 10, 100 μ g/mL을 1시간 전처리 후 100 ng/mL LPS를 23시간 더 처리하였다. 배양액을 회수하여 Griess reagent를 동량으로 반응시켜 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 이용해 표준곡선을 그려 nitrite 농도를 결정하였고 결과값은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

(4) LPS에 의한 iNOS 생성에 관한 영향측정

60 mm dish에 BV2 세포를 1.0 \times 10⁶/dish로 seeding하고 37°C의 5% CO₂, 95% air에서 24시간 배양하였다. 울

금과 강황 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 각각 1시간 전처리하고 LPS 100 ng/mL 를 넣고 23시간 더 반응시켰다. 반응이 끝난 세포를 스크래퍼를 이용하여 모은 후 lysis시켜 일정량의 단백질을 얻었다. 단백질을 정량 후 전기영동장치를 이용하여 10% SDS-acrylamide gel에 로딩하고 membrane에 이동시킨 후 1차 항체로 iNOS(1 : 5,000), β -actin(1 : 5,000), 2차 항체로 anti-rabbit HRP-conjugated (1 : 2,000)를 각각 반응시켰다. 각 과정마다 멤브레인을 TBST로 15분간 4번씩 세척하였다. 항체반응을 마친 멤브레인은 ECL detection kit를 이용하여 LAS-4000 mini system (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan)을 통해 노출되도록 하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 표시하였다. 본 연구의 통계처리는 SPSS 12.0K for Windows 프로그램을 사용하였으며, one way ANOVA와 t -test를 이용하여 평균값의 유의성을 5% 미만의 한계로 조사하였다.

결 과

1. DPPH radical과 ABTS cation 소거 활성 비교

DPPH radical과 ABTS cation 소거능력은 시료의 흡

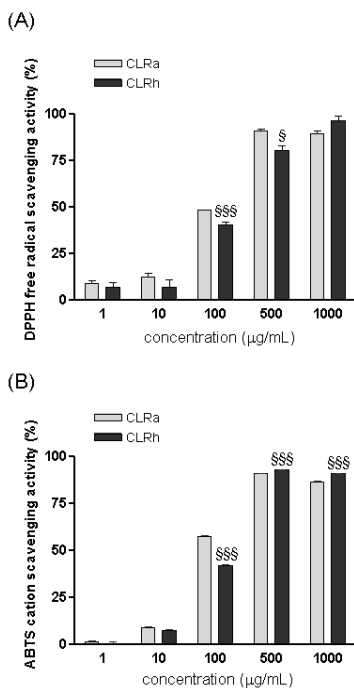


Fig. 1. Radical scavenging activity of CLRa and CLRh

DPPH free radical (A) and ABTS radical cation (B) scavenging activities at concentrations of 1~1,000 $\mu\text{g/mL}$. Values are indicated as the $\text{mean} \pm \text{SEM}$. §§§ $p < 0.001$, § $p < 0.05$ compared with the each concentration between the CLRa and CLRh groups.

광도가 감소되는 정도에 따라 나타내는 것으로 울금과 강황의 농도별 DPPH free radical과 ABTS cation 소거활성을 Fig. 1에 나타내었다. 울금 1~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 DPPH radical 소거 활성은 8.79~89.24%, ABTS cation 소거 활성은 1.16~86.40%로 나타났다. 강황 추출물은 1~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 DPPH radical 소거 활성은 6.61~26.24%, ABTS cation 소거 활성은 6.41~90.73%로 나타났다. 울금 및 강황 약물 농도와 free radical 및 cation 소거활성에 따른 분석결과 DPPH 실험에서 50%의 소거활성에 필요한 농도는 울금과 강황 각각 123.73, 221.50 $\mu\text{g/mL}$ 였고 ABTS 실험에서의 50%의 소거활성에 필요한 농도는 각각 66.25, 141.63 $\mu\text{g/mL}$ 였다 (Table 1). IC_{50} 값과 함께 약물 농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 두 약물간 비교했을 때, 울금이 강황보다 라디칼 소거능이 우수함을 확인할 수 있었다.

Table 1. IC_{50} Numeric Values in DPPH and ABTS Assays, and Determination of Total Polyphenol Contents

	CLRa ($\mu\text{g/mL}$)	CLRh ($\mu\text{g/mL}$)
DPPH IC_{50}	123.73 \pm 8.68	221.50 \pm 25.26 [§]
ABTS IC_{50}	66.25 \pm 1.42	141.63 \pm 1.39 ^{§§§}
TPC	142.34 \pm 0.52	152.75 \pm 0.91 ^{§§}

Values are indicated as the $\text{mean} \pm \text{SEM}$. §§§ $p < 0.001$, § $p < 0.01$, § $p < 0.05$ compared with the CLRa group.

2. 총 폴리페놀 함량 비교

울금과 강황 10 mg/mL 에서 tannic acid의 검량선으로부터 폴리페놀 함량을 구한 결과 각각 142.34와 152.75 $\mu\text{g/mL}$ 의 tannic acid가 포함되어 있었다 (Table 1). 총 폴리페놀 함량에서는 강황 추출물이 울금 추출물보다 높은 함량을 보였다.

3. PC12 세포에서 울금과 강황의 H_2O_2 로 유도된 세포독성에 미치는 영향 비교

울금과 강황이 PC12 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 울금과 강황의 농도별 약물처리에 따른 세포 생존률과 H_2O_2 에 대한 세포보호 효과를 측정해 본 결과는 Fig. 2와 같다. PC12 세포에 울금과 강황 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 만을 처리한 경우에는 대조군과 비교하여 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 2A). 반면 H_2O_2 독성에 대한 울금과 강황의 보호 효과를 측정할 결과, H_2O_2 에 의하여 세포 생존율이 대조군 대비 56.56%로 감소하였고 ($p < 0.001$), 울금과 강황(1~100 $\mu\text{g/mL}$)의 전처리에 의하여 각각 55.47~54.34%, 57.72~53.79%의 생존율을 나타내어 H_2O_2 로 유도된 세포독성에 대한 두 약물 간의 보호 효과에는 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2B).

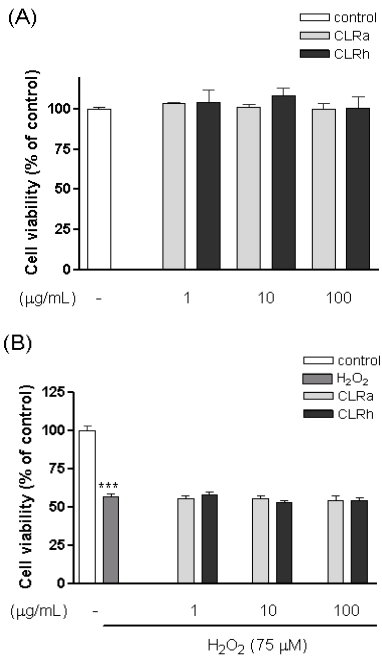


Fig. 2. Effect of CLRa and CLRh on H₂O₂-induced toxicity in PC12 cells

The cells were treated with CLRa and CLRh for 24 h (A). The cells were treated with 75 μM H₂O₂ for 23 h after pretreatment with CLRa and CLRh for 1 h (B). Cell viability were measured using the MTT assay and were expressed as a percentage of the control. Values are given as the mean±SEM. *** *p* < 0.001 compared with the control group

4. PC12 세포에서 울금과 강황의 H₂O₂에 의한 ROS 생성에 관한 영향 비교

PC12 세포에 울금과 강황을 농도별로 전처리하고 H₂O₂에 대하여 유도되는 ROS의 영향을 측정하였다. H₂O₂ 처

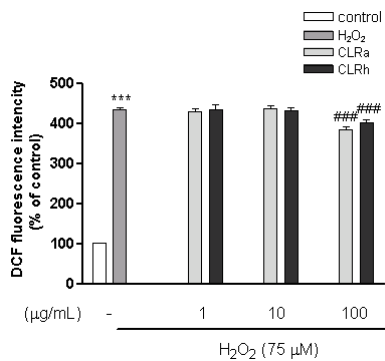


Fig. 3. Effect of CLRa and CLRh on the H₂O₂-induced ROS production in PC12 cells

The cells were pre-treated with CLRa and CLRh for 1 h before stimulation with 75 μM H₂O₂. ROS generation was measured by the fluorescence intensity of DCFH DA after H₂O₂ stimulation for 30 min. Values are given as the mean±SEM. *** *p* < 0.001 compared with the control group. ### *p* < 0.001 compared with the H₂O₂-only treated group.

리에 의하여 ROS 유의하게 생성되었고(*p* < 0.001), 이에 대하여 울금과 강황 100 μg/mL 농도에서 ROS 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 100 μg/mL 농도에서 두 약물 간의 ROS 생성 억제활성을 비교해 보았을 때 울금과 강황의 억제활성에는 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3).

5. BV2 세포에서 울금과 강황의 LPS로 유도된 세포독성에 미치는 영향 비교

울금과 강황이 BV2 세포에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 울금과 강황의 농도별 약물처리와 LPS에 독성에 대한 세포 생존율을 측정된 결과는 다음 Fig. 4와 같다. BV2 세포에 울금과 강황 1 ~100 μg/mL만을 처리한 결과에서는 대조군 대비 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 4A). BV2 세포에 LPS를 처리한 후의 세포 생존율은 대조군과 대비하여 95.96 %로 감소하였지만(*p* < 0.01), 염증유발에는 영향을 미치지 않을 정도였으며, 울금과 강황의 전처리 1 μg/mL 농도를 제외하고 BV2 세포 생존율에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 4B).

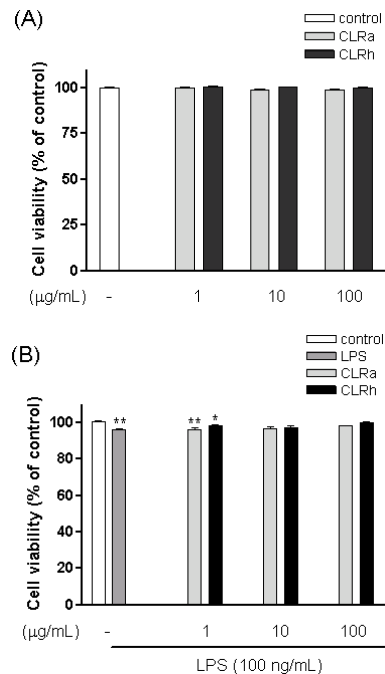


Fig. 4. Effect of CLRa and CLRh on LPS-induced toxicity in BV2 cells

The cells were treated with CLRa and CLRh for 24 h (A). The cells were treated with 100 ng/mL LPS for 23 h after pretreatment with CLRa and CLRh for 1 h (B). Cell viability were measured using the MTT assay and were expressed as a percentage of the control. Values are given as the mean±SEM. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 compared with the control group.

6. BV2 세포에서 울금과 강황의 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향 비교

BV2 세포에 울금과 강황을 농도별로 처리하고 1시간 후 LPS 100 ng/mL을 23시간 더 처리하여 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성량을 측정하였다. LPS에 의하여 NO의 생성이 대조군 대비 879.63% 증가하였으며($p < 0.001$), 울금과 강황 전처리에 의해 농도 의존적으로 NO의 과생성이 억제되었다. 특히, 약물농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 울금과 강황의 NO 생성 억제는 대조군 대비하여 각각 237.39와 475.86 %로 두 약물 모두 우수한 NO 억제효과를 보였으며 같은 농도에서 울금이 강황보다 LPS에 의해 유도된 NO의 억제효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5)

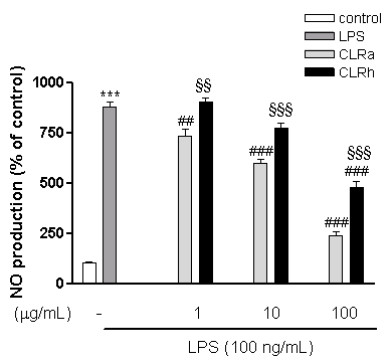


Fig. 5. Effect of CLRa and CLRh on the LPS-induced production of NO in BV2 cells

The cells were pre-treated with CLRa and CLRh for 1 h before stimulation with 100 ng/mL LPS. NO generation was determined by the nitrite level in the supernatant using the Griess reagent colorimetric reaction. Values are given as the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ compared with the control group. ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$ compared with the LPS-only treated group. §§§ $p < 0.001$, §§ $p < 0.01$ compared with the each concentration between the CLRa and CLRh groups.

7. BV2 세포에서 울금과 강황의 LPS에 의한 iNOS 생성에 미치는 영향 비교

울금과 강황의 LPS로 유도된 NO생성 억제 효과를 확인한 후 iNOS에 대한 영향을 알아보기 위하여 western blotting 방법으로 iNOS를 측정하였다. BV2 세포에 울금과 강황을 농도별로 처리하고 1시간 후 LPS 100 ng/mL을 23 시간 더 처리하여 LPS에 의해 iNOS를 유도하였다. LPS에 의하여 iNOS의 발현이 유의하게 증가하였고, 울금 100 $\mu\text{g/mL}$ 전처리에 의해서 iNOS 발현이 감소하였다. 하지만, 강황 100 $\mu\text{g/mL}$ 전처리에 의한 iNOS 생성 억제효과가 미미하였으며, NO 결과와 유사하게 울금이 강황보다 iNOS 억제효과는 더 좋았지만 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 6).

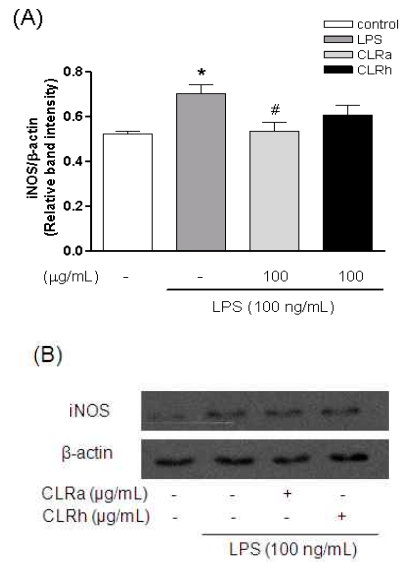


Fig. 6. Effect of CLRa and CLRh on the LPS-induced production of iNOS in BV2 cells

The cells were pre-treated with CLRa and CLRh for 1 h before stimulation with 100 ng/mL LPS. iNOS protein was detected by Western blotting using iNOS primary antibody. β -Actin was included as a control. Values are given as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with the control group. # $p < 0.05$ compared with the LPS-only treated group.

고찰

본 연구에서는 울금과 강황 물 추출물의 PC12 및 BV2 세포에서의 H_2O_2 와 LPS로 유발한 독성에 대한 항산화 및 항염증 효능의 비교 연구를 수행하였다.

산화스트레스와 염증반응은 뇌질환 및 심혈관계 질환을 비롯하여 주요 질환의 병인으로 작용하고 있다²¹⁻²³. 산화스트레스는 세포내에서 hydroxy radical 등의 활성산소 생성과 이를 방어하는 항산화 메커니즘의 균형이 깨지면서 발생하는 것으로 활성산소의 증가로 인한 라디칼의 생성이 세포 내 미토콘드리아의 파괴, 단백질 및 DNA 변형, 지질과산화물을 일으켜 세포손상을 준다²⁴. 염증반응은 대식세포 및 마이크로글리아 세포의 활성화로 인한 염증인자의 증가로 나타나는 것으로, 정상적인 상태에서는 항원인식으로 인한 항원항체 반응으로 제거하는 역할을 하지만 과활성이 되면 병인으로 작용하게 된다²⁵. 염증반응과 관련이 깊은 마이크로글리아 세포는 대식작용(phagocytosis), 항원표식작용(antigen presentation), 사이토카인(cytokine)과 ROS 또는 NO와 같은 염증매개인자의 분비 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁶.

첫 번째로 울금과 강황의 라디칼 소거능을 알아보기 위해 DPPH radical과 ABTS radical cation의 소거능, 그리고 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. DPPH assay는 안정화된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질인 DPPH가 전자나 수소를 받아 안정한 분자를 이루고 자색이 탈

색이 되는 원리를 이용한 시험법²⁷⁾으로 울금과 강황의 IC₅₀이 각각 123.73, 328.10 µg/mL를 나타내어 울금이 강황보다 라디칼 소거능이 높음을 알 수 있었다. Potassium persulfate의 존재하에 H₂O₂나 peroxidase 등과 반응하여 양이온을 형성함으로써 지용성과 수용성의 항산화물에 모두 반응을 할 수 있는 ABTS 실험²⁸⁾에서 울금과 강황의 IC₅₀ = 66.25, 141.63 µg/mL로 DPPH와 유사하게 울금이 더 높은 소거능을 보였다(Fig 1, Table 1). 폴리페놀은 천연식물에 널리 분포되어 항산화 물질로 대표적으로 녹차의 catechin과 검은콩의 안토시안 등이 알려져 있다. 울금과 강황의 폴리페놀 함량은 각각 142.34와 152.75 µg/mL를 포함하고 있었고 강황의 함량이 울금보다 높았다(Table 1).

두 번째로, H₂O₂에 대한 세포보호 효과를 비교하기 위하여 PC12 세포에서 MTT와 ROS assay를 수행하였다. MTT assay는 MTT 물질이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 succinate dehydrogenase와 반응하여 나타나는 색의 변화로서 미토콘드리아의 활성을 통해 세포 생존율을 측정할 수 있는 방법이다. 본 실험에서 울금과 강황의 전처리는 H₂O₂로 유도된 세포독성에 대해 보호 효과의 차이를 나타내지 않았다(Fig 2). H₂O₂는 산화 스트레스를 유도하는 독성물질로 ROS를 생성하며, ROS는 세포를 산화스트레스 상태에 이르게 하는 주요 물질로 세포의 산화적 손상을 야기한다²⁹⁾. ROS 측정 실험 결과에서 H₂O₂에 의해 ROS 생성이 증가하였으며 이에 울금과 강황 100 µg/mL에서 억제 효과를 보였지만 두 약물 간에 활성에는 차이가 없었다(Fig 3).

다음으로 BV2 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 증가에 대한 영향을 알아보기 위하여 MTT assay 및 NO, iNOS 측정 실험을 수행하였다. LPS는 마이크로글리아 세포의 활성을 유도하여 interferon-γ, tumor necrosis factor-α, interleukin 1-β 등의 pro-inflammatory cytokine을 생성하고 iNOS와 cyclooxygenase와 같은 enzyme의 과잉조절로 인해 세포의 염증반응과 세포사멸을 유발하게 된다²³⁾. NO는 ONOO-로 변화되어 세포 내 중요한 기능을 매개함과 동시에 과 발현시 신경세포 사멸의 원인으로 알려져 있는 물질로 산화 스트레스 상태에서 증가하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 본 실험에서 울금과 강황 추출물은 BV2 세포 생존율에 영향을 미치지 않았고 LPS 의해 세포 생존율이 약간 감소하였지만 실험에는 영향을 미치지 않았다(Fig 4). 반면 NO 실험 결과에서는 LPS에 의해 급격히 증가한 NO의 생성이 울금과 강황 100 µg/mL 전처리에 의해서 억제되었으며, 같은 농도에서 울금이 강황보다 NO 생성 억제능이 뛰어났다(Fig 5). iNOS는 NO를 생성하는 전단계의 물질로 LPS에 의해 유도된다고 잘 알려져 있다. Western blotting 방법으로 iNOS의 발현정도를 측정한 결과, LPS에 의해 iNOS가 유도되었고 울금 100 µg/mL 전처리에 의해서만 통계적으로 유의한 억제효과를 보였다. 하지만 강황 100 µg/mL 전처리에 의해서는 iNOS가 억제되지 않았고, 강황과 울금 두 약물 간의 효과 차이는 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig 6).

한의학적으로 염증은 外邪 또는 熱에 의해 氣血 등이 응체되어 나타나는 것으로 보고 寒의 성질이 있는 淸熱藥에 속한 약물들로 치료를 해왔다³⁰⁾. 이에 溫의 성질을 가진 강황보다 寒의 성질을 가진 울금이 LPS로 유도된 발열 및 염증반응에 우수한 효과를 보인 것으로 여겨진다. 또한 울금과 강황의 주성분으로 curcumin의 항염증 작용은 매우 우수하다고 보고가 되어 있지만^{16,17)}, 울금물 추출물이 보다 황색을 띄는 강황에 비해 효과가 더 좋았던 점을 감안할 때 울금의 항염증 효과는 울금 자체의 차가운 성질 및 curcumin과 더불어 포함되어 있는 여러 성분의 복합작용에 기인한 것으로 보인다. 그리고 울금의 寒한 성질이 心으로 歸經하여 淸心하는 효능을 가지는데, iNOS 억제제가 NO의 과생성이 나타나는 심부전에 효과가 있다는 보고^{21,31,32)} 등으로부터 울금이 iNOS와 NO를 억제하는 것이 심혈관계 질환뿐만 아니라 염증반응을 매개하는 질환에 효과적인 약물로 사용될 수 있다고 본다. 본 연구의 결과, 울금이 강황보다 라디칼 소거능과 항염증 활성이 우수함을 확인할 수 있었고, 산화 스트레스 및 염증 작용에 의한 여러 가지 질환에 울금이 효과적으로 사용될 수 있다고 사료된다.

결론

본 연구에서는 울금과 강황의 라디칼 소거능과 H₂O₂와 LPS 독성을 이용하여 항산화 및 항염증 활성에 대하여 비교 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH radical scavenging activity와 ABTS radical cation decolorization activity를 측정한 결과, 울금과 강황의 농도 의존적 소거능을 확인하였고, 울금이 강황보다 높은 라디칼 소거능을 보였으며 총 폴리페놀 함량은 강황이 울금보다 더 높았다.
2. PC12 세포에서 울금과 강황의 세포 생존율 실험 결과 울금과 강황 1~100 µg/mL 농도에서 생존율에 영향을 미치지 않았으며, H₂O₂에 의한 세포독성과 ROS 생성에 대해서는 울금과 강황의 세포보호 및 ROS 생성 억제 활성에 차이를 보이지 않았다.
3. BV2 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 및 iNOS 생성이 울금과 강황에 의해 억제되었으며, 울금이 강황보다 높은 NO 및 iNOS 억제 효과를 보였다.

이상의 결과에서 울금이 강황과 비교하여 라디칼 소거능 및 항염증 효과가 더 우수함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 한의약선도기술개발사업의 지원(B090039)에 의하여 이루어졌음

참고문헌

1. 식품의약품안전청. 대한약전. 신일북스. 2008 : 905-6, 960.
2. 식품의약품안전청. 한약재 관능검사지침 I. 이문기업. 2006 : 20, 76.
3. 생약학교재편찬위원회. 생약학. 동명사. 2008 : 169-71.
4. 김호철. 한약약리학. 집문당. 2001 : 327.
5. 서부일, 최호영. 임상 한방 본초학. 영림사. 2004 : 585-9.
6. 김창렬. 랫트의 간손상에 대한 울금 추출물의 간 기능 개선 효과. 한국축산식품학회지. 2006 ; 26(3) : 386-93.
7. 강재구, 강효진, 서지혜, 김선옥, 최정효, 조도연, 박창교, 이회영. 낫토균으로 발효한 발효울금의 투여가 마우스의 간 기능 및 혈중 지질 함량에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 2009 ; 38(4) : 430-35.
8. 안봉전, 이진영, 박태순, 편정란, 배호경, 송미애, 백은지, 박정미, 손준호, 이창언, 최경임. 추출조건에 따른 울금의 항산화 및 미백효과. 한국약용작물학회지. 2006 ; 14(3) : 168-72.
9. Selvam R, Subramanian L, Gayathri R, Angayarkanni N. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). Journal of Ethnopharmacology. 1995 ; 47 : 59-67.
10. 이재열, 김용래, 황문제, 구병수, 김근우. 울금의 항우울 효과에 대한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 2007 ; 18(2) : 45-55.
11. 윤주호, 류봉하, 김진성, 윤상협. 강황이 수종의 암세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2006 ; 27(2) : 429-43.
12. 이상현, 안영민, 안세영, 김영옥, 이병철. 강황이 고환 절제수술 및 testosterone으로 유발된 rat의 전립선 비대증에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008 ; 30(2) : 355-64.
13. 박세근. 신경아세포에서 과산화수소의 세포사멸에 대한 강황의 보호작용. 세명대학교. 2007.
14. Quiles JL, Mesa MD, Ramírez-Tortosa CL, Aguilera CM, Battino M, Gil A, Ramírez-Tortosa MC. Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2002 ; 22 : 1225-31.
15. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Diaz-Alperi J, Ramirez A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review Archives of Gerontology and Geriatrics. 2002 ; 34 : 37-46.
16. Camacho-Barquero L, Villegas I, Sánchez-Calvo JM, Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Motilva V, Lastra CA. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. International Immunopharmacology. 2007 ; 7 : 333-42.
17. Jung KK, Lee HS, Cho JY, Shin WC, Rhee MH, Kim TG, Kang JH, Kim SH, Hong S, Kang SY. Inhibitory effect of curcumin on nitric oxide production from lipopolysaccharide-activated primary microglia. Life Science. 2006 ; 79 : 2022-31.
18. Araújo CAC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2001 ; 96(5) : 723-8.
19. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958 ; 181 : 1190-200.
20. George P, Dimlrios B. Antioxidant Effect of Natural Phenols on Olive Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1991 ; 68 : 669-71.
21. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. Arterioscler Thrombosis, and Vascular Biology. 2005 ; 25 : 29-38.
22. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. European Journal of Pharmacology. 2001 ; 429 : 195-207.
23. Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's Disease. Clinical Neuroscience Research. 2006 ; 6 : 261-81.
24. Sayre ML, Perry G, Smith AM. Oxidative stress and neurotoxicity. Chemical Research in Toxicology 2008 ; 21 : 172-88.
25. Nathan C. Points of control in inflammation. Nature. 2002 ; 420(6917) : 846-52.
26. Vilhardt F. Microglia: phagocyte and glia cell. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2005 ; 37 : 17-21.
27. Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology International. 2002 ; 8 : 121-37.
28. Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry. 2001 ; 73 : 239-44.
29. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. Journal of Experimental Biology. 2003 ; 206 : 1107-15.

30. 한방약리학교재편찬위원회. 한방약리학. 신일북스. 2009 ; 107-8.
31. Ishibashi Y, Takahashi N, Tokumaru A, Karino K, Sugamori T, Sakane T, kodani N, Kunizawa Y, Yoshitomi H, Sato H, Oyake N, Murakami Y, Shimada T. Activation of inducible NOS in peripheral vessels and outcomes in heart failure patients. *Journal of Cardiac Failure*. 2008 ; 14(9) : 724-31.
32. Ishibashi Y, Shimada T, Murakami Y, Takahashi N, Sakane T, Sugamori T, Ohata S, Hashimoto M. An inhibitor of inducible nitric oxide synthase decreases forearm blood flow in patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001 ; 38(5) : 1470-6.