

## Human Umbilical Vein Endothelial Cells에서 녹차씨껍질 에틸아세테이트 추출물의 세포부착물질 및 염증매개인자 생성 억제효과

노경희<sup>†</sup> · 김종경 · 송영선  
인제대학교 식품생명과학부, 기초과학연구소

### Suppressive Effects of Ethyl Acetate Fraction from Green Tea Seed Coats on the Production of Cell Adhesion Molecules and Inflammatory Mediators in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Kyung-Hee Noh<sup>†</sup>, Jong-Kyung Kim, and Young-Sun Song

School of Foods and Life Science and Institute of Basic Sciences, Inje University, Gyeongnam 621-749, Korea

#### Abstract

Anti-atherogenic effects in tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) are involved with suppressed oxidative stress, cell adhesion molecules, and pro-inflammatory factors. The aim of this study was to determine whether green tea seed coat ethyl acetate fraction (GTSCE) could modulate cell adhesion molecules and inflammatory mediators in HUVEC stimulated with TNF- $\alpha$ . Nitric oxide (NO) production was significantly increased in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC compared to TNF- $\alpha$  only treated cells. The NO that is produced by endothelial nitric oxide synthase dilates blood vessels and has protective effects against platelet and leucocyte adhesion. GTSCE at 25, 50, 75, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  significantly ( $p < 0.05$ ) reduced TNF- $\alpha$  production. GTSCE significantly ( $p < 0.05$ ) inhibited soluble vascular cell adhesion molecule-1 level, in a dose-dependent manner. Monocyte chemoattractant protein-1 level was also significantly ( $p < 0.05$ ) inhibited by GTSCE treatment at 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  compared to the TNF- $\alpha$ -only treated group. Total antioxidant capacity by GTSCE was significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced compared to the TNF- $\alpha$ -only treated group. These results suggest that GTSCE can inhibit the production of cell adhesion molecules and inflammatory mediators and could be used as a candidate bioactive material to prevent the development of atherosclerosis.

**Key words:** HUVEC, green tea seed coat, pro-inflammatory mediators, cell adhesion molecules

#### 서 론

동맥경화의 발생에 산화적 스트레스가 중요한 역할을 한다는 사실은 알려져 있으며 생체 내에서 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)과 peroxynitrite 등과 같은 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)의 과다한 생성은 지질의 과산화, 특히 low-density lipoprotein(LDL)의 산화적 변형을 유발함으로써 동맥경화와 같은 심혈관질환의 초기발병과 진행에 핵심적인 역할을 한다(1). 최근에는 혈관질환의 발생 원인으로 혈관 내에서의 염증반응에 대한 관심이 증가되고 있다. 염증은 조직의 손상을 비롯한 외부로부터의 자극 등 다양한 감염원에 대한 체내 반응 중 하나로서(2,3) 국소혈관과 다양한 면역세포가 유기적인 상호작용을 하게 된다. 이 과정에서 대식세포와 같은 염증세포들이 활성화되면서 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), tumor necrosis factor-

$\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) 등 다량의 염증 매개 인자를 분비하게 된다(4).

동맥경화 유발은 각종 위험인자들의 반복되는 물리적 또는 화학적 자극 및 생물학적 손상에 의한 혈관 내피세포의 손상에 의한 것이며 내피세포의 손상에 산화적 스트레스와 염증이 중요한 역할을 한다는 인식이 대두되고 있다는 것이다(5,6). 동맥경화와 산화적 스트레스, 염증과의 연관성은 죽상동맥경화의 진행과정에서 나타난다. 죽상동맥경화 발병은 산화된 LDL이 혈액 중의 단핵구를 내막 안으로 유입시키면서 시작된다. 유입된 단핵구는 대식세포로 분화되어 산화된 LDL을 탐식하고 활성화된 대식세포가 되어 거품세포를 형성하고 평활근 세포에 축적되어 죽상동맥경화를 일으키게 된다(7). 또한 활성화된 대식세포는 여러 가지 cytokine과 활성 산소종을 생성하여 염증반응의 전사인자인 nuclear factor  $\kappa$ B(NF $\kappa$ B)를 활성화시키며 그 결과 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)를 발현

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: khnoh1999@hanmail.net  
Phone: 82-55-320-3235, Fax: 82-55-321-0691

시켜 염증을 일으키고, 세포부착분자인 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)과 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 등을 발현시켜 혈액 중의 단핵구 유입을 도와 동맥경화를 계속 진행시킨다(8). 그러므로 동맥경화는 만성적 염증 질환이라 할 수 있다(1,5). 이러한 염증반응이 혈관 내에서 지속적으로 또는 과도하게 일어나면 동맥경화의 초기반응이 활성화(9,10). NF $\kappa$ B는 세포질 속에서 p50과 p65의 heterodimer와 방해 단백질인 I $\kappa$ B와 함께 불활성형으로 존재하다가 활성 산소종, LPS, cytokine 같은 염증성 자극에 의해 I $\kappa$ B kinase가 활성화되어 I $\kappa$ B가 분해되면 p50과 p65의 heterodimer 형태로 활성화되어 핵으로 이동하여 염증반응을 유도하는 cytokine, iNOS, COX-2, adhesion molecule인 VCAM-1과 ICAM-1의 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(11-13).

녹차엽의 폴리페놀류는 flavonols와 flavan-3-ols로 주요한 flavonol은 quercetin과 kaempferol의 glycosides이다(14). 녹차의 flavone-3-ol을 기본으로 하는 catechins으로서 (+)-catechin, (-)-epigallocatechingallate(EGCG), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechingallate(EGC), (-)-epicatechin(EC)가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(4). 한잔의 녹차에는 150~200 mg의 EGCG가 포함되어 있으며(15) 녹차씨에는 생리적 활성 물질인 사포닌, 플라보노이드류, 비타민과 올레인산 등을 풍부하게 함유하고 있어(15-18) 항염증 및 항산화 활성을 가질 것으로 기대된다. 그러나 녹차씨껍질에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구는 TNF- $\alpha$ 로 산화적 스트레스를 유발시킨 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)에 녹차씨껍질 EtOAC 추출물을 처리하여 세포부착분자와 염증매개인자에 미치는 영향을 분석하여 녹차씨껍질의 동맥경화 예방 성분으로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 녹차씨껍질 EtOAC 추출물 조제

본 연구에서 사용한 녹차씨껍질은 2009년 경남 화동소재 일송제다에서 구입하여 사용하였다. 녹차씨껍질(green tea seed coat, GTSC)은 녹차씨를 둘러싸고 있는 가장 바깥부분으로 깨끗하게 세척한 후 50 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C에서 3일간 열풍 건조하여 40 mesh로 분쇄하였다. 녹차씨껍질 분말의 10배의 주정을 가해 80 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 추출하여 감압여과한 후 evaporator를 사용하여 건조시켜 에탄올(EtOH) 추출물을 조제하였다. 녹차씨껍질의 EtOH 추출물의 회수율은 3.64%이었다. 본 연구에서 사용한 에틸아세테이트(EtOAC) 추출물은 다음과 같이 추출하였다. 녹차씨껍질 분획추출물 조제는 EtOH 추출물 10 g을 증류수 500 mL을 가해 용해시킨 후 석유에테르 500 mL을 가하여 혼합한 후 PE층인 위층을

회수하였으며 같은 방법으로 2회 반복 추출하였다. 남은 물층에 에틸아세테이트(EtOAC) 500 mL을 가하여 혼합한 후 EtOAC층인 위층을 회수하였으며 같은 방법으로 2회 반복 추출하였다. 남은 물층에 부탄올(BuOH) 500 mL을 가하여 혼합한 후 BuOH층인 위층을 회수하였으며 같은 방법으로 2회 반복 추출하였으며 남은 하층은 물층으로 하였다. EtOH 추출물 10 g 당 PE 분획층 2.499 g, EtOAC 분획층 3.365 g, BuOH 분획층 2.355 g, H $_2$ O 분획층 0.668 g으로 EtOAC 추출물의 회수율이 가장 높은 수준인 녹차씨껍질 EtOAC 추출물을 시료로 사용하였다. 본 연구에서 사용한 녹차씨껍질 EtOAC 추출물의 catechin류, caffeic acid, tannic acid의 함량을 HPLC를 사용하여 분석한 결과 EGC(1146.5 $\pm$ 11.01  $\mu$ g/g), tannic acid(967.0 $\pm$ 32.24  $\mu$ g/g), EC(70.9 $\pm$ 4.39  $\mu$ g/g), gallic acid(47.6 $\pm$ 1.03  $\mu$ g/g), caffeic acid(37.7 $\pm$ 1.46  $\mu$ g/g), ECG(35.5 $\pm$ 3.19  $\mu$ g/g), EGCG(15.5 $\pm$ 0.09  $\mu$ g/g)가 함유되어 있었다.

### 세포 배양 및 시료처리

HUVEC은 Modern Tissue Technologies Inc.(MC 1133, Seoul, Korea)에서 구입하여 passage 3~7번까지 사용하였으며, EMB-2 Bullet kit를 이용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  조건하에서 배양하였다. EMB-2 배지는 사용 전 EGM-2 Single-Quots(10% fetal bovine serum, hydrocortisone, hFGF-B, vEGF, R3-IGF-I, ascorbic acid, hegf. GA-1000, heparin)을 넣고 잘 섞어서 사용하였다. Confluent한 세포는 Hepes buffered saline solution을 주입하여 씻어내고, trypsin-EDTA solution(0.25 mg/mL)을 넣어 flask에 부착한 세포를 떼어내고 trypsin neutralizing solution을 첨가하여 원심분리(1,000 rpm, 5분)하였다. 침전물에 새로운 배지를 넣어서 cell count하여 세포를, 24-well plate(1 $\times$ 10 $^6$  cells/well)에 주입하여 24시간 동안 CO $_2$  incubator에서 배양한 후, 농도별로 조제한 녹차씨껍질 EtOAC 추출물(0~100  $\mu$ g/mL)을 처리하여 2시간 배양한 후 산화적 손상을 유발하기 위해 TNF- $\alpha$ (10 ng/mL)를 첨가하고 20시간 배양하여 실험에 이용하였다. 이때 untreated군은 TNF- $\alpha$ 를 처리하지 않은 negative control을 나타내고 control군은 TNF- $\alpha$ 를 처리한 positive control을 나타낸 것이다.

### 세포 독성

세포 생존율은 MTT 방법(19)으로 분석하였다. 24 well의 배지를 제거하고, 1 mg/mL 농도가 되도록 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 첨가한 후, 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 살아있는 세포에서 mitochondria dehydrogenases에 의해 MTT가 formazan dye 결정으로 전환되며 여기에 DMSO 150  $\mu$ L를 첨가하여 세포에서 formazan dye를 용해시켜낸 다음 microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control에 대한 흡광도 값을 나누어 백분율로 나타내었다.

**Nitric oxide 생성량**

Nitric oxide(NO) 생성 정도는 Green 등의 방법(20)으로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 nitrite 양을 측정하여 결정하였다. 100 µL의 배지 상등액에 50 µL의 1% sulphanilamide(in 5% phosphoric acid)와 50 µL의 0.1% naphthyl-enediamine dihydrochloride을 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 NaNO<sub>2</sub>를 농도별로 조제하여 사용하였다.

**PGE<sub>2</sub>와 TNF-α 생성량**

면역세포의 대표적인 염증인자인 PGE<sub>2</sub> 생성 저해 효과는 PGE<sub>2</sub> assay kit(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 ELISA 분석을 하였다. 염증인자로 염증성 cytokine인 TNF-α 생성 억제 효과는 TNF-α assay kit (R&D Systems, Inc.)을 사용하여 ELISA 분석을 하였다.

**VCAM-1와 MCP-1 생성량**

세포부착물질인 VCAM-1과 MCP-1 생성 저해 효과는 VCAM-1과 MCP-1 assay kit(R&D Systems, Inc.)을 사용하여 ELISA 분석을 하였다.

**총 항산화능**

총 항산화능은 Erel(21)의 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazaline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical cation decolorization assay로 분석하여 mM trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)로 표시하였다.

**통계처리**

통계분석은 SPSS software(Version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였으며 모든 결과는 mean±SE로 표시하였고 각 군 간의 유의성은 one-way ANOVA와 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 검정하였다.

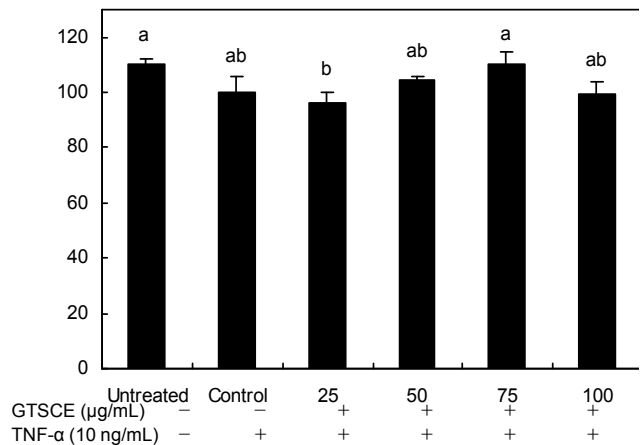
**결 과**

**세포 독성**

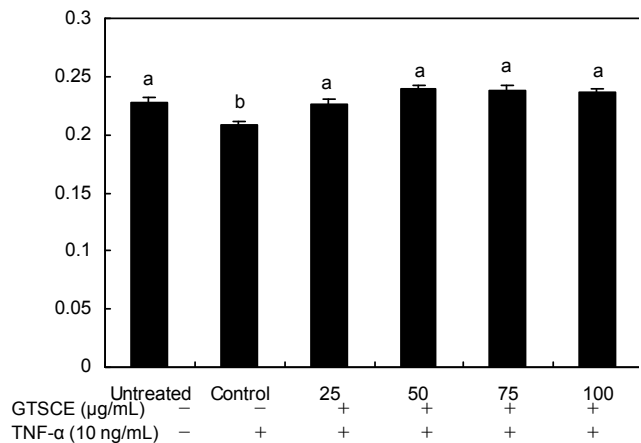
녹차씨껍질 EtOAC 추출물의 세포독성을 세포 생존율로 확인한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같으며 본 연구에서 처리한 농도 수준 0~100 µg/mL에서 세포 생존율은 TNF-α 대조군과 차이를 보이지 않았으며 따라서 녹차씨껍질 EtOAC 층은 세포 독성을 가지지 않는 것으로 나타났다.

**NO 생성능**

Fig. 2에서 보듯이 TNF-α로 산화적 스트레스를 유발시킨 HUVEC에서의 NO의 생성능은 녹차씨껍질 EtOAC 추출물을 처리한 군에서 control군에 비해 유의적으로(p<0.05) 증가하여 untreated의 수준과 유사하였으며, HUVEC에서 녹차씨껍질 EtOAC 추출물은 NO를 소량 증가시키는 것을 알 수 있었으나 농도의존적인 효과를 나타내진 않았다.



**Fig. 1.** Effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coat on cell viability in TNF-α-stimulated HUVEC. Cells (1×10<sup>6</sup>/well) were incubated with and without indicated concentrations of green tea seed coat ethyl acetate extract for 2 hr, and then incubated with TNF-α (10 ng/mL) for 20 hr. Untreated is negative control without TNF-α treatment, while control is positive control treated with TNF-α. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05. GTSCE: green tea seed coat ethyl acetate fraction.



**Fig. 2.** Effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coat on NO production in TNF-α-stimulated HUVEC. Refer to Fig. 1.

NO는 고도로 활성화된 gas로 신경계와 면역계의 중요한 신호전달 분자이며, 세포 내에서 NO synthase(NOS)에 의해 합성된다(22). 포유동물의 경우 3가지의 NOS가 존재하는데 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS)가 그것이다. nNOS와 eNOS는 항상 발현되어 있으며 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin에 의해 조절되지만 iNOS는 interleukine, interferon, LPS와 같은 염증성 자극에 의해 전사 조절되어 염증반응에 관여한다. nNOS나 eNOS에 의해 소량 생성된 NO는 혈관확장, 신경전달, 병원체에 대한 세포 파괴 등과 같은 정상적인 생리기능을 담당한다(5,23). eNOS는 다양한 자극에 반응하는 혈관확장의 중요한 매개자로 작용하며, 혈관 본래의 기능과 구조를 유지하게 하며 혈소판의

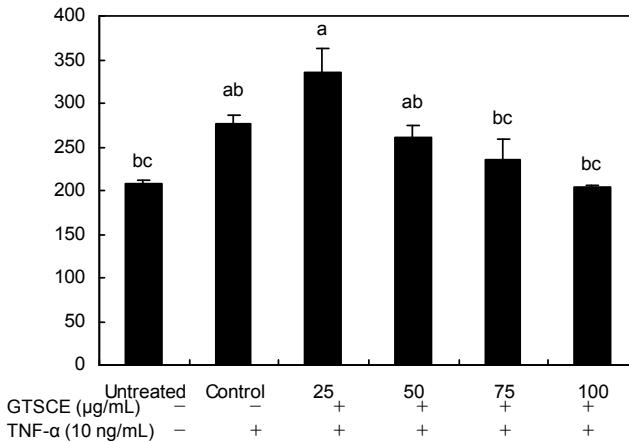


Fig. 3. Effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coat on PGE<sub>2</sub> level in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC. Refer to Fig. 1.

응고와 혈전 형성을 방지하여 혈관의 항상성을 유지하는데 기여한다(22). 내피세포에서는 'constitutive' NO-synthase (eNOS)에 의해 NO가 생성되며(24) eNOS는 TNF- $\alpha$ 를 포함한 cytokine이 존재하면 생성이 감소된다(25). eNOS 생성이 저해되면 내피의 기능장애를 가져오며 NO를 발생시키는 내피의 능력을 손상시키고 혈관확장을 감소시키는 이상을 가져오게 된다(26).

따라서 녹차씨껍질 EtOAC 추출물이 HUVEC에서 TNF- $\alpha$ 로 인한 산화적 스트레스 유발 시 NO 생성을 증가시켜 혈관확장과 혈소판 응집을 억제하여 혈류의 흐름을 원활하게 하여 순환기 질환으로부터 인체를 보호해 줄 것으로 보인다.

#### PGE<sub>2</sub> 생성량

녹차씨껍질 EtOAC 추출물이 HUVEC에서 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향은 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Untreated군에 비해 control군에서 PGE<sub>2</sub>의 생성이 다소 증가시키는 것으로 나타났으나 녹차씨껍질 EtOAC 추출물의 처리는 PGE<sub>2</sub>의 생성능에 영향을 미치지 않았다.

여러 다양한 조직에서 물질대사를 조절하는 prostaglandin(PG)은 평활근의 수축과 이완, 혈관의 수축과 확장, 혈압 조절, 발열유발, 염증유발 등과 같은 다양한 신체기능에 관여하는 물질 중 하나로 arachidonic acid로부터 합성되며 cyclooxygenase(COX)라는 효소가 관여한다(27,28). PG는 모두 8종으로 알려져 있으며, PGE<sub>2</sub>는 PG 합성효소에 의해 PGH<sub>2</sub>가 합성될 때 형성되며(29) 염증성 질환을 포함한 다양한 생체반응에 있어서도 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로써 각종 질병의 유발과 진행에 관여한다(30).

따라서 본 연구의 결과 TNF- $\alpha$ 로 유도된 HUVEC에서 녹차씨껍질 EtOAC 추출물의 처리는 control군에 비해 PGE<sub>2</sub>의 수준을 다소 낮추어 주는 경향을 보였으나 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

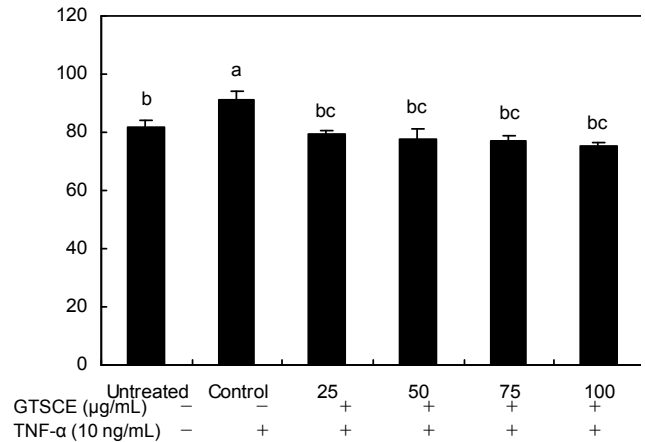


Fig. 4. Effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coat on TNF- $\alpha$  level in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC. Refer to Fig. 1.

#### TNF- $\alpha$ 생성능

녹차씨껍질 EtOAC 추출물이 HUVEC에서 TNF- $\alpha$ 의 생성에 미치는 효과는 Fig. 4와 같으며 control군의 TNF- $\alpha$  수준은 untreated군에 비해 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가하였다. TNF- $\alpha$ 만 처리한 control군에 비해 녹차씨껍질 EtOAC 추출물을 처리한 군에서 TNF- $\alpha$  수준이 현저하게 감소하여 녹차씨껍질 EtOAC 추출물이 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 생성을 저해하는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 는 여러 가지 염증성 질환 및 숙주방어에서 가장 중요한 조절자로 알려져 있으며(31,32) 인체에서 과잉 생성 시 질병을 일으키고(33) TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 동맥경화 plaque에서 발견되는 일반적인 cytokines이다(34). TNF- $\alpha$ 는 중요한 pro-atherogenic factor로서 함축되며(35,36), 역시 미토콘드리아의 산화제 생성을 통해 세포의 효과를 조절하는 것으로 알려져 있다(37). 또한, 동맥경화 cascade에서 중요한 요소는 TNF- $\alpha$ 와 같은 local inflammatory cytokines의 증가이며 동맥경화 병소 발달의 중요한 성분이기도 하다(38). 즉, TNF- $\alpha$ 는 넓고 다양한 생리학적 활성으로 대식세포, 내피세포와 평활근 세포에 의해 생산되는 다면발현성(pleiotropic) pro-inflammatory cytokine으로 작용하며(38), ICAM과 VCAM의 유도에 의해 백혈구 구르기(rolling), 부착 및 이주(emigration) 증가와 같은 강력한 pro-atherogenic 효과를 발휘한다(39).

따라서 녹차씨껍질 EtOAC 추출물은 동맥경화 유발에 중요한 인자인 TNF- $\alpha$  생성을 억제시켜 TNF- $\alpha$ 로 산화적 스트레스를 유발한 HUVEC에서 동맥경화를 저해하는 것으로 보인다.

#### VCAM-1와 MCP-1 수준

TNF- $\alpha$ 로 자극한 HUVECs에서 녹차씨껍질 EtOAC 추출물이 cell adhesion molecule(CAM)의 생성에 미치는 효과를 동맥경화의 제1초기 현상을 나타내는 VCAM-1과 MCP-1의 수준으로 확인하였다. VCAM-1의 농도는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 control군에서 가장 높은 수준을 보였으며

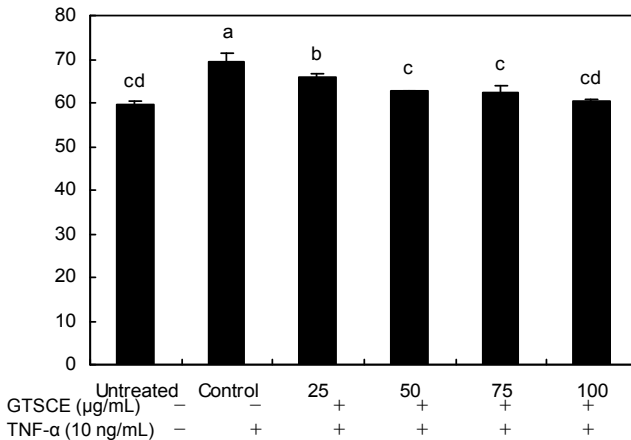


Fig. 5. Effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coat on VCAM-1 production in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC. Refer to Fig. 1.

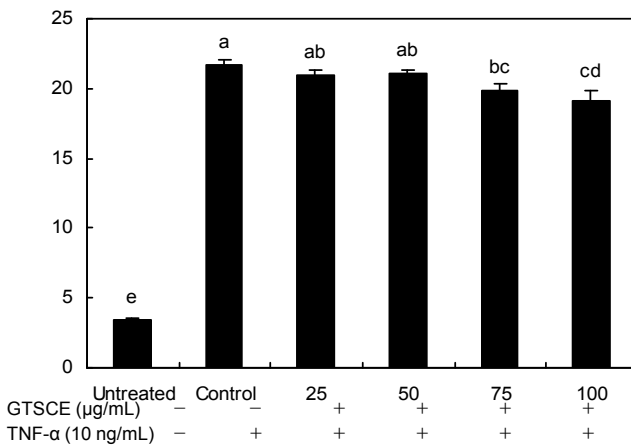


Fig. 6. Effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coat on MCP-1 production in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC. Refer to Fig. 1.

녹차씨껍질 EtOAC 추출물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 VCAM-1의 수준을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 녹차씨껍질 EtOAC 추출물을 50  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도로 처리하였을 때 untreated군과 유사한 수준을 보였다. MCP-1의 농도는 Fig. 6에서와 같이 control군에 비해 녹차씨껍질 EtOAC 추출물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 MCP-1의 수준을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다.

혈관 내피의 산화적 손상과 분자염증 반응에 대한 관심이 높는데, 혈관 내피의 산화적 손상은 혈관의 염증을 유발시키고 단핵구가 혈관 내피에 부착하게 되는 것으로 동맥경화의 발단이 된다는 점에서 혈관 내피는 동맥경화의 발생 기전에 있어서 중요한 장소라고 할 수 있다(40). 단핵구와 혈관 내피 세포 사이의 관계는 세포 부착인자인 VCAM-1과 ICAM-1 등에 의해 조절되는데, 염증이 발생하게 되면 이들 부착인자의 발현이 증가하게 되고, 혈관 내피로 부착된 단핵구에 의해 동맥경화가 진행하게 된다(41,42).

따라서 녹차씨껍질 EtOAC 추출물의 처리는 TNF- $\alpha$ 로

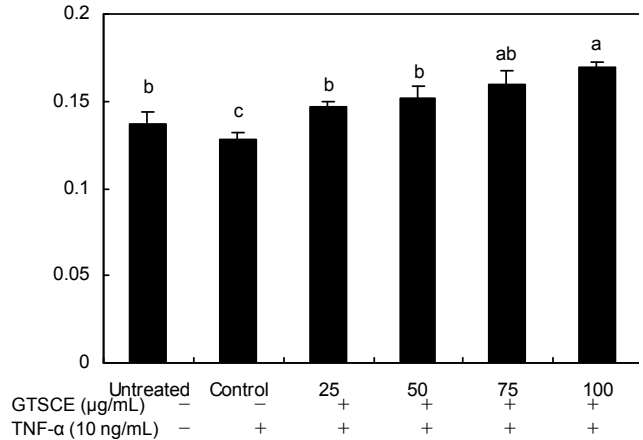


Fig. 7. Effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coat on total antioxidant capacity by ABTS method in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC. Refer to Fig. 1.

산화적 스트레스를 유발시킨 HUVEC에서 농도 의존적으로 세포부착물질인 VCAM-1과 MCP-1의 생성을 억제하는 것으로 보아 녹차씨껍질 EtOAC 추출물이 동맥경화를 유발시키는 인자인 CAMs의 생성을 효과적으로 감소시켜 동맥경화 초기 반응을 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 총 항산화능

산화적 스트레스에 대한 녹차씨껍질의 방어능을 평가하기 위해 ABTS를 사용하여 분석한 총 항산화능 수준은 Fig. 7과 같다. 녹차씨껍질 EtOAC 추출물을 처리한 군에서는 control군에 비해 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 수준으로 나타나 녹차씨껍질 EtOAC 추출물은 총 항산화능을 증가시켜 활성 산소를 소거하는 기능을 가지는 것으로 보인다. 활성 산소종은 DNA, 지질, 단백질과 같은 중요한 세포내 물질과 반응하여 조직손상을 야기하므로 항산화활성을 가지는 플라보노이드는 활성 산소종에 의해서 야기되는 손상으로부터 세포를 보호하여 건강을 유지할 수 있도록 해준다. 녹차에는 폴리페놀성 화합물인 카테킨을 비롯한 quercetin과 kaempferol 등의 여러 성분이 함유되어 있어(14,43), 항산화효과가 뛰어나 생체 내외의 stress에 의해 발생하는 유리기를 제거하는 기능이 있다고 알려져 있다(44,45). 녹차의 항산화 작용에 대한 연구로는 Nakayama 등의 연구(46)에서 카테킨의 폴리페놀 구조들이 hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ )에 의한 세포 독성을 억제하는 효과가 있으며 지질과산화 초기단계에서 singlet oxygen과 유리기 제거 역할로 플라보노이드가 효과적이라고 하였다. 이러한 보고들은 본 연구의 결과와 유사하다.

따라서 녹차씨껍질 EtOAC 추출물에 의해 총 항산화능의 수준이 증가하는 것은 항산화 능력이 향상됨을 보여주는 것이며, TNF- $\alpha$ 에 의한 산화적 스트레스를 저하하는 효과가 있는 것을 보여준다 하겠다.

## 요 약

본 연구는 TNF- $\alpha$ 로 자극된 HUVEC에서 녹차씨껍질 EtOAC 추출물이 초기 동맥경화 과정에 중요한 역할을 하는 염증매개인자와 세포부착물질에 미치는 영향을 분석하였다. 녹차씨껍질 EtOAC 추출물의 NO 생성능은 TNF- $\alpha$ 만을 처리한 control군에 비해 증가시키는 것을 알 수 있었다. 100  $\mu$ g/mL 농도에서는 녹차씨껍질 EtOAC 추출물은 세포독성을 보이지 않았으며 염증매개인자인 TNF- $\alpha$  수준 및 세포부착물질인 VCAM-1과 MCP-1의 생성을 억제하였다. 뿐만 아니라, 녹차씨껍질 EtOAC 추출물은 총 항산화능은 증가되는 경향을 보였다. 이상의 결과에서, 녹차씨껍질 EtOAC 추출물은 HUVEC에서 TNF- $\alpha$ 로 인한 총 항산화능의 수준을 향상시켜 염증생성인자인 TNF- $\alpha$  수준 및 세포부착물질인 VCAM-1과 MCP-1의 생성을 억제하여 동맥경화 초기반응을 억제하는데 기여할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(2009-0067086) 결과이므로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 29-38.
- Mariathasan S, Monack DM. 2007. Inflammation adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 31-40.
- Zedler S, Faist E. 2006. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 12: 595-560.
- Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13: 85-94.
- Yun HJ, Heo SK, Lee YT, Park WH, Park SD. 2008. Anti-inflammatory effect of *Evodia officinalis* DODE in mouse macrophage and human vascular endothelial cells. *Kor J Herbology* 23: 29-38.
- Stenvinkel P. 2003. Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. *J Ren Nutr* 13: 144-148.
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
- Ito T, Ikeda U. 2003. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2: 257-265.
- Cheon MS, Yoon T, Choi G, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Choo BK, Kim HK. 2009. Comparative study of extracts from rhubarb on inflammatory activity in RAW 264.7 cells. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 109-114.
- Li JJ, Zhu CG, Yu B, Liu YX, Yu MY. 2007. The role of inflammation in coronary artery calcification. *Ageing Res Rev* 6: 263-270.
- Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR. 2001. Possible new role for NF- $\kappa$ B in the resolution of inflammation. *Nat Med* 7: 1291-1297.
- Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. 1999. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B. *FEBS Lett* 442: 89-94.
- Allenm R, Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499.
- Lee HB, Kim EK, Park SJ, Bang SG, Kim TG, Chung DW. 2010. Isolation and characterization of nicotiflorin obtained by enzymatic hydrolysis of two precursors in tea seed extract. *J Agric Food Chem* 58: 4808-4813.
- Yoon WH, Choi JH, Lee KH, Kim CH. 2005. Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L. *Korean J Food Sci Technol* 37: 108-112.
- Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS. 2006. Enzyme preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54: 2951-2956.
- Rah HH, Baik SO, Han SB, Bock JY. 1992. Chemical compositions of the seed of Korean green tea plant (*Camellia sinensis* L.). *J Korean Agric Chem Soc* 35: 272-275.
- Yosioka I, Nishimura T, Matsuda A, Kitagawa I. 1970. Saponin and saponogenol. II. Seeds saponogens of *Thea sinensis* L. Theasapogenol A. *Chem Pharm Bull* 18: 1621-1632.
- Bernas T, Dobrucki J. 2002. Mitochondrial and non-mitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47: 236-242.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}$ N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
- Erel O. 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reaction. *Clin Biochem* 37: 112-119.
- Mnocada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. 1999. Nitric oxide as signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Biol Chem* 34: 879-886.
- Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. 1992. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FBSS Lett* 307: 287-293.
- Mohamed F, Monge JC, Gordon A, Cernacek P, Blais D, Stewart DJ. 1995. Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 15: 52-57.
- Vallance P, Collier J. 1994. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *Br Med J* 309: 453-457.
- Kim TH, Ko SS, Park C, Park SE, Hong SH, Kim BW, Choi YH. 2010. Anti-inflammatory effects of *Nerium indicum* ethanol extracts through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *J Liê Sci* 20: 1221-1229.
- Lee HH, Park C, Kim MJ, Seo MJ, Choi SH, Jeong YK, Choi YH. 2010. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E<sub>2</sub> production through down-regulation of NF- $\kappa$ B activity by the extracts of fermented beans. *J Liê Sci* 20: 388-395.
- Balzary RW, Cocks TM. 2006. Lipopolysaccharide induces epithelium- and prostaglandin E(2)-dependent relaxation of mouse isolated trachea through activation of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. *J Pharmacol Exp Ther* 317:

- 806-812.
30. Lee EM, Choi YJ, Lee J, Ku L, Kim KH, Choi JS, Lim SJ. 2006.  $\alpha$ -Tocopheryl succinate, in contrast to  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate, inhibits prostaglandin E<sub>2</sub> production in human lung epithelial cells. *Carcinogenesis* 27: 2308-2315.
  31. Kim EH, Rhee DK. 2009. Anti-oxidative properties of ginseng. *J Ginseng Res* 33: 1-7.
  32. Seals DF, Courtneidge SA. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17: 7-30.
  33. Xu B, Nakhla S, Makris A, Hennessy A. 2011. TNF- $\alpha$  inhibits trophoblast integration into endothelial cellular networks. *Placenta* 32: 241-246.
  34. Ozer N, Tangurek B, Firat F, Ozer S, Tartan Z, Ozturk R, Ozey B, Ciloglu F, Yilmaz H, Cam N. 2008. Effects of drug-eluting stents on systemic inflammatory response in patients with unstable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels* 23: 75-82.
  35. Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. 2002. Tumor necrosis factor- $\alpha$  central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 849-854.
  36. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fuji H, Saito K, Seishima M. 2005. Disruption of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 180: 11-17.
  37. Finkel T, Holbrook JN. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 408: 239-249.
  38. Gao X, Xu X, Belmadani S, Park Y, Tand Z, Feldman A, Chilian W, Zhang C. 2007. TNF- $\alpha$  contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1269-1275.
  39. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, Takemura Y, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H. 2009. Klotho suppresses TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- $\kappa$ B activation. *Endocrine* 35: 341-346.
  40. Rong Y, Geng Z, Lau BH. 1996. *Ginkgo biloba* attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 20: 121-127.
  41. Stein O, Thiery J, Stein Y. 2002. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 160: 1-10.
  42. Lee CH, Yi HS, Kim JE, Heo SK, Cha CM, Won CW, Park SD. 2009. Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of fractionated extracts of *Smilacis glabrae* rhizoma in human umbilical vein endothelial cell. *Kor J Herbology* 24: 39-50.
  43. Hayashi E, Hayashi M, Yamazoe H. 1990. Pharmacological action of tea extracts on the central nervous system in mice. *Oyo Yakuri* 40: 351-356.
  44. Kim MJ, Choi JH, Yang JA, Kim SY, Kim JH, Lee JH, Kim JK, Rhee SJ. 2002. Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutr Res* 22: 733-744.
  45. Cho SY, Oh YJ, Park JY, Lee MK, Kim MJ. 2003. Effect of dandelion leaf extracts on (*Taraxacum officinale*) hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 458-463.
  46. Nakayama T, Yoshizaki A, Izumida S, Suehiro T, Miura S, Uemura T, Yakata Y, Shichijo K, Yamashita S, Sekin I. 2007. Expression of interleukin-11 (IL-11) and IL-11 receptor alpha in human gastric carcinoma and IL-11 upregulates the invasive activity of human gastric carcinoma cells. *Int J Oncol* 30: 825-833.

(2011년 2월 23일 접수; 2011년 3월 23일 채택)