

蘇木이 산화적 손상 및 Raw 264.7 cell과 HUVEC에서의 염증 유관 인자에 미치는 영향

강성순, 김명신, 조재준, 최성안, 양의호, 전상윤, 최창원, 홍 석
동신대학교 한의과대학 내과학교실

The impact of *Caesalpinia Sappan L.* on Oxidative Damage and Inflammatory Relevant Factor in RAW 264.7 Cells and HUVEC

Seong-sun Kang, Myung-sin Kim, Jae-jun Jo, Seong-an Choi, Eui-ho Yang
Sang-yun Jeon, Chang-won Choi, Soek Hong
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives : This study investigated the impact of *Caesalpinia sappan L.* on oxidative damage and inflammatory relevant factor in RAW 264.7 cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Methods : We determined whether fractionated EtOH extracts of *Caesalpinia sappan L.* (CSL) inhibit free radical generation such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 cells and HUVEC.

Result :

1. DPPH removal capacity was increased by CSL.
2. LPS-induced ROS, and NO inhibitory capacity were increased by CSL.
3. LPS-induced cell death of Raw 264.7 cells was decreased by CSL.
4. The amount of cytokine generation in Raw 264.7 cell was decreased significantly by CSL.
5. The amount of cytokine generation in HUVEC was decreased significantly by CSL.

Conclusions : These results suggest that CSL supplement may attenuate oxidative stress by elevated antioxidative processes, and suppress inflammatory mediator activation.

Key words : *Caesalpinia sappan L.*, Raw 264.7 cell, HUVEC, oxidative stress, inflammation, cytokine

1. 서 론

산화적 손상이란 몸의 항상성을 유지하기 위한 산화 촉진물질과 산화 억제물질간의 균형의 문제

로 산화가 촉진되어 나타나는 세포에 유해한 작용을 말하며¹, 이는 노화와 관련이 크며 체내 DNA 손상, 세포막의 손상, 단백질과 지질의 산화 등을 초래해 동맥 경화 및 암 등과 같은 만성질환을 유발시키는 것으로 알려져 있다².

- 교신저자: 홍 석 전남 순천시 이수로 331
동신대학교 순천한방병원 2내과 2진료실
TEL: 061-729-7155
E-mail: 17under@hamail.net
- 이 논문은 2012년도 동신대학 대학원 한의학 석사학위 논문임.

염증은 손상에 대한 조직의 반응으로 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 방어기전이다³. 이는 대식세포 등의 활성화로 여러 염증인자의 증가로 나타나는데, 정상에서는 항원항체 반응

으로 항원을 제거하는 역할이지만, 과활성이 되면 병인으로 작용하여 알레르기, 아토피, 관절염, 심장병, 뇌질환, 순환기 장애뿐만 아니라 암 등과 같은 다양한 질환의 원인을 제공하게 된다^{4,5}.

최근에는 산화적 손상과 염증 반응을 만성 질환의 중요한 기전으로 인식하고 있으며, 이와 관련된 연구들이 피부 노화⁶⁻⁸, 동맥 경화⁹⁻¹¹, 만성 폐질환¹², 염증성 부인과 질환^{13,14}, 만성 염증성 장 질환¹⁵ 등 여러 분야에서 이루어지고 있다.

蘇木은 蘇方木(*Caesalpinia sappan* L.: 소방목)의 心材를 건조한 것으로 活血祛瘀시켜 消腫止痛의 작용이 있어 外科의 요약이 되고, 또한 婦女的 血瘀로 인한 병증에 적용되고 있다¹⁶.

蘇木에 관한 연구에 있어서 임 등¹⁷, 권 등¹⁸ 및 이¹⁹의 연구는 항산화 효과에 대한 것이며, 정²⁰ 등의 연구는 RAW 264.7 cell을 이용하여 항염증 효과에 대한 것이었으나, 세포를 이용하여 蘇木의 항산화 효과 및 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)에서의 염증 유관인자에 미치는 영향에 관한 연구는 없었다.

본 연구에서는 蘇木을 에탄올 추출하고 그 추출물을 이용하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 및 RAW 264.7 cell에서의 reactive oxygen species(ROS)와 nitric oxide(NO)에 미치는 영향을 통해 항산화 활성을 측정하였다. 또한 蘇木의 항염증 활성을 조사하기 위하여 RAW 264.7 cell과 HUVEC에 Lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 염증 반응을 유도시켜서, 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는지 관찰하였는데 그 지표로서 pro-inflammatory cytokines인 IL-1 β , IL-6, INF- γ , MCP-1, TNF- α 생성량을 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 방법

1. 재 료

본 실험에 사용된 소목(蘇木, 학명 : *Caesalpinia sappan* L.)은 동신대부속 순천한방병원에서 구입

하여 정선한 후 사용하였다.

蘇木 30 g에 80% EtOH 500 ml을 넣고 환류 추출한 후, 여과하여 증류장치로 농축하였다. 농축액을 freeze dryer를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말 2.5 g(수율: 8.3%; 이하 CSL이라 칭함)을 냉동 보관(-80 °C) 하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 시료 High performance liquid chromatography (HPLC) 패턴 분석

CSL 3 mg을 에탄올 1 ml에 녹여 0.45 μ m membrane filter로 여과 후 이 중 20 μ l를 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC는 Shimadzu(Japan)사의 system controller(CBM-20A), pump(LC-20AD), column oven(CTO-20A), UV/VIS detector(SPD-20A)를 사용하였으며, column은 ACE 5 C18(250 \times 4.6 mm, 5 μ m)을 사용하였다. 이동상은 water(A)와 acetonitrile (B)로 gradient elution system을 적용시켜 5%(0분 B), 5-10%(20분 B), 10-20%(10분 B), 20-40%(20분 B), 40-100%(10분 B)로 설정하였다. 유속은 1.0 ml/min이었으며 column 온도는 40 °C를 유지하였다. UV wavelength는 288 nm로 설정하여 분석하였다.

3. 항산화 활성 측정

1) DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 소거능 측정

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μ l와 CSL(각 25, 50, 100, 200, 400, 800 μ g/ml) 100 μ l 를 각각 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응 시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정 후 아래의 식에 따라 계산하였다.

DPPH 소거능(%) =

$$\left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{CSL처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2) Reactive oxygen species(ROS) 생성 억제능 측정

RAW 264.7 cell 내에서 reactive oxygen speies (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescin diacetate(DCF-DA)를 이용하였다. 48 well plate에 RAW 264.7 cell를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하였다. 24시간 동안 배양 한 후, 여기에 LPS 2 $\mu\text{g/ml}$ 및 CSL 각 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각의 well에 첨가한 후, 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 모든 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후 DCF-DA 10 μM 이 되도록 첨가하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 염색하였다. 염색 후 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기(flow cytometer, BECTON Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

3) Nitric oxide(NO) 생성 억제능 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell은 96well plates에 104 cells/well로 분주하여 24 시간 동안 배양 한 후, CSL 각 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer 50 μl 를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소반응 후, N2 buffer 50 μl 를 각 well에 처리하고, 10분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

4. RAW 264.7 cell에서의 항염증 측정

1) 세포독성 측정

RAW 264.7 cell을 96well plates에 10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, CSL을 각각 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후, 10 μl 의 WST solution을 첨가한

후 CO₂ 배양기(37 °C, 5% CO₂)에서 30분 반응 시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

2) RAW 264.7 cell의 세포사멸 억제 효과 측정

RAW 264.7 cell에 LPS와 CSL을 함께 처치하여 배양하였을 때 유도되는 세포사멸 현상에 대하여 알아보았다. 48 well plate에 RAW 264.7 cell을 2×10^5 cells/well/400 μl 씩 첨가하고 LPS 2 $\mu\text{g/ml}$ 및 CSL 각 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 처리한 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 세척용액[Flow Wash Buffer(0.1% sodium azide와 1% FBS를 포함하는 PBS buffer)]으로 두 번 세척한 세포에 FITC-labeled annexin V(2.5 μl), Propidium Iodide(PI)가 함유되어 있는 부착용액 [binding buffer(10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4)] 100 μl 를 첨가하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에 방치하였다. PBS 400 μl 를 추가로 넣고 부유한 다음 유세포 분석기를 이용하여 FITC-labeled annexin V, PI 염색 되어진 세포의 형광강도의 세기를 측정하여 세포사를 관찰하였다.

3) Cytokine 생성량 측정

RAW 264.7 cell을 96 well plates에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, CSL를 각각 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, LPS 2 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-6, MCP-1, TNF- α 를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 측정하였다. 분석은 Luminex system을 이용한 Milliplex analyst를 통해 이루어졌다.

5. HUVEC에서의 항염증 측정

1) 세포독성 측정

CSL의 세포독성 여부를 확인하기 위해 HUVEC을 이용하여 세포독성을 확인하였다. HUVEC은 5×10^3 cells/100 μl 의 농도로 96 well plate에 분주한 다음 24시간 후에 새로운 배지로 씻어낸다. CSL을 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 48시간 동안

배양하였다. 배양 후 10 µl의 MTT solution을 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에 4시간 동안 반응시킨 후 solubilization solution을 넣고 24시간 동안 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 wave length 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Cytokine 생성량 측정

24 well plates에 4×10⁴ cells/500 µl의 농도로 분주해 놓은 HUVEC에 CSL을 50, 100 µg/ml 농도로 1시간 동안 전 처리한 후 LPS 2 µg/ml을 처리하였다. 이를 24시간 배양한 후 상청액을 모아 ELISA kit로 IL-1β, IL-6, INF-γ, TNF-α 생성량을 측정하였다. 분석은 Luminex system을 이용한 Milliplex analyt를 통해 이루어졌다.

6. 통계분석

본 실험에서 얻은 결과를 multi t-test(JAVA, Bonferroni Ver 1.1)로 분석하여 p값을 구하였다. 각 대조군을 정상군과, 실험군을 대조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. HPLC 패턴 분석

CSL을 HPLC로 pattern 분석한 결과 288 nm에서 retention time이 23.4분, 26.6분, 30.2분대에 peak가 확인되었고 이 중 23.4분대의 peak는 지표성분인 brazilin이었다(Fig. 1).

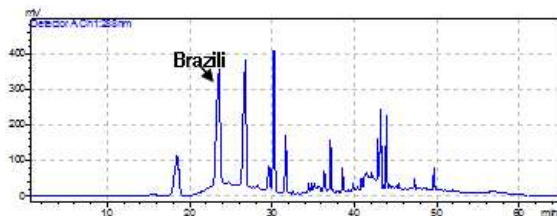


Fig. 1. HPLC chromatogram of 80% ethanol extract of *Caesalpinia sappan* L..

2. 항산화 활성 측정

1) DPPH 소거활성 효과

DPPH의 소거 활성은 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml 농도에서 각각 71.0±2.7, 84.8±1.6%, 86.9±0.3, 87.0±0.9%, 86.8±0.4%, 87.9±0.2%로 나타났다.

2) ROS 생성 억제 효과

RAW 264.7 cell에서 ROS의 생성량(%)을 측정된 결과, 정상군에서 0.59%, 대조군에서 31.89%, CSL10에서 20.03%, CSL20에서 17.73%, CSL40에서 13.68%로 나타나 CSL군에서 농도 의존적으로 감소하였다.

3) NO 생성 억제 효과

RAW 264.7 cell에서 NO의 생성량(%)을 측정된 결과, 정상군에서 29.5±4.4%, 대조군에서 100.0±4.1%, CSL10에서 71.2±5.5%, CSL20에서 42.8±6.2%, CSL40에서 20.0±5.8%로 나타나 CSL군에서 농도 의존적으로 감소하였다.

3. RAW 264.7 cell에서의 항염증 측정

1) RAW 264.7 cell에서의 세포독성에 미치는 효과

CSL의 RAW 264.7 cell에 대한 세포독성을 관찰한 결과 대조군의 세포생존을 100±13.9%로 했을 때, CSL의 10, 20, 40 µg/ml 농도에서는 각각 119.4±16.0%, 115.2±9.4%, 106.6±3.3%로 나타났다.

2) RAW 264.7 cell의 세포사멸 억제 효과

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 세포사멸을 측정된 결과 정상군에서 0.53%, 대조군에서 29.68%, CSL10 투여군에서 18.22%, CSL20 투여군에서 14.54%, CSL40 투여군에서 10.68%로 나타나 CSL군에서 농도 의존적으로 감소하였다.

3) RAW 264.7 cell에서 Cytokine 생성 억제 효과

(1) IL-6 생성 억제 효과

LPS에 의해 유도된 IL-6 생성량은 대조군을 100%로 하였을 때, 정상군이 0%, CSL10투여군에서 95.0±5.0%, CSL20투여군에서 74.0±13.0%, CSL40투여군에서 34.0±3.8%로 나타나 CSL투여군에서 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, CSL40투여군에서 유의성(p<0.001) 있게 감소하였다(Fig. 2).

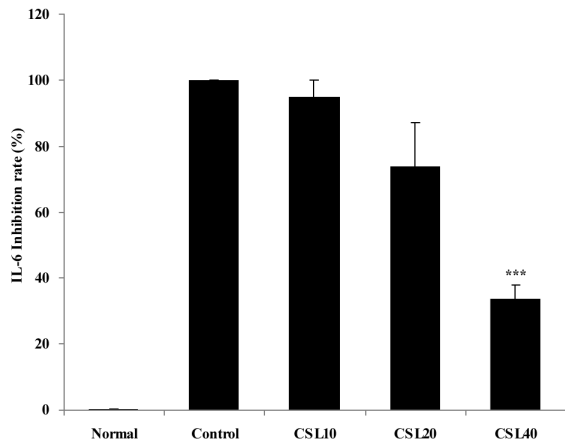


Fig. 2. Effects of CSL on levels of IL-6 in RAW 264.7 cells.

The levels of IL-6 were determined using a Luminex system.

Normal : RAW 264.7 cells, control : RAW 264.7 cells and LPS (2 μ g/ml), CSL10 : RAW 264.7 cells and LPS and CSL 10 μ g/ml, CSL20: RAW 264.7 cells and LPS and CSL 20 μ g/ml, CSL40 : RAW 264.7 cells and LPS and CSL 40 μ g/ml Values represent the means \pm SD of three experiments. Statistically significant value compared with control by *t* test (***) : $p < 0.001$).

CSL : *Caesalpinia sappan L.*, LPS : lipopolysaccharide

(2) MCP-1 생성 억제 효과

LPS에 의해 유도된 MCP-1 생성량은 대조군을 100%로 하였을 때, 정상군이 1.0 \pm 0%, CSL10투여군에서 96.0 \pm 7.5%, CSL20투여군에서 83.0 \pm 6.8%, CSL40투여군에서 74.0 \pm 3.4%로 나타나 CSL투여군에서 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, CSL40투여군에서 유의성있게($p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 3).

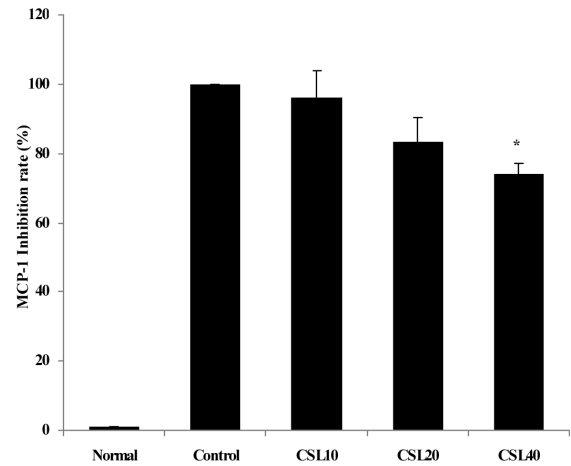


Fig. 3. Effects of CSL on levels of MCP-1 in RAW 264.7 cells.

The levels of MCP-1 were determined using a Luminex system.

Normal : RAW 264.7 cells, control : RAW 264.7 cells and LPS (2 μ g/ml), CSL10 : RAW 264.7 cells and LPS and CSL 10 μ g/ml, CSL20 : RAW 264.7 cells and LPS and CSL 20 μ g/ml, CSL40 : RAW 264.7 cells and LPS and CSL 40 μ g/ml Values represent the means \pm SD of three experiments. Statistically significant value compared with control by *t* test (* : $p < 0.05$).

CSL : *Caesalpinia sappan L.*, MCP : monocyte chemoattractant protein, LPS : lipopolysaccharide

(3) TNF- α 생성 억제 효과

LPS에 의해 유도된 TNF- α 생성량은 대조군을 100%로 하였을 때, 정상군이 16.0 \pm 0%, CSL10투여군에서 104.0 \pm 4.2%, CSL20투여군에서 93.0 \pm 10.8%, CSL40투여군에서 72.0 \pm 0.8%로 나타나 CSL투여군에서 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였고, CSL40투여군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있게 감소하였다(Fig. 4).

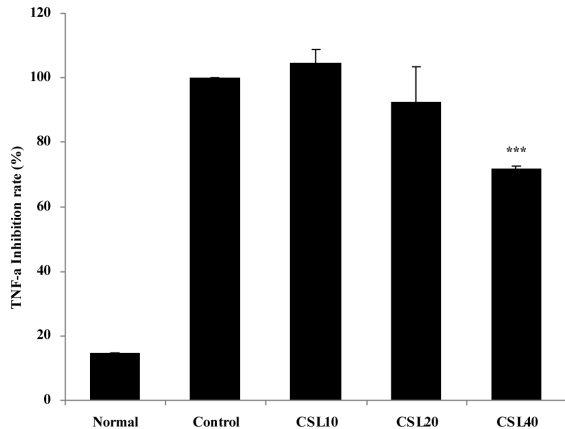


Fig. 4. Effects of CSL on levels of TNF- α in RAW 264.7 cells.

The levels of TNF- α were determined using a Luminex system.

Normal : RAW 264.7 cells, control : RAW 264.7 cells and LPS (2 μ g/ml), CSL10 : RAW 264.7 cells and LPS and CSL 10 μ g/ml, CSL20 : RAW 264.7 cells and LPS and CSL 20 μ g/ml, CSL40 : RAW 264.7 cells and LPS and CSL 40 μ g/ml. Values represent the means \pm SD of three experiments. Statistically significant value compared with control by *t* test (***) : $p < 0.001$.

CSL : *Caesalpinia sappan L.*, TNF : tumor necrosis factor, LPS : lipopolysaccharide

4. HUVEC에서의 항염증 측정

1) HUVEC에서의 세포독성에 미치는 효과

CSL의 HUVEC에 대한 세포독성을 측정한 결과 대조군의 세포생존율 100 \pm 0.5%로 했을 때, CSL의 50, 100, 200 μ g/ml 농도에서는 각각 100.7 \pm 2.0%, 98.4 \pm 2.2%, 85.7 \pm 1.2%로 나타났다.

2) HUVEC에서 Cytokine 생성 억제 효과

(1) IL-1 β 생성 억제 효과

HUVEC에서 LPS에 의해 유도된 IL-1 β 생성량은 대조군을 100%로 하였을 때, 정상군이 32.1 \pm 1.4%, CSL50투여군에서 56.4 \pm 1.8%, CSL100투여군에서 53.5 \pm 1.6%로 CSL투여군에서 모두 유의성($p < 0.001$) 있게 감소하였다(Fig. 5).

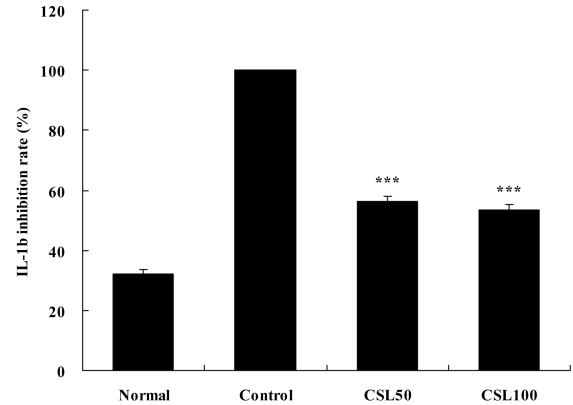


Fig. 5. Effects of CSL on levels of IL-1 β in HUVEC.

The levels of IL-1 β were determined using a Luminex system.

Normal : Only HUVEC, control : HUVEC and LPS (2 μ g/ml), CSL50 : HUVEC and LPS and CSL 50 μ g/ml, CSL100 : HUVEC and LPS and CSL 100 μ g/ml

Values represent the means \pm SD of three experiments. Statistically significant value compared with control by *t* test (***) : $p < 0.001$.

CSL : *Caesalpinia sappan L.*, HUVEC : human umbilical vein endothelial cells, LPS : lipopolysaccharide

(2) IL-6 생성 억제 효과

HUVEC에서 LPS에 의해 유도된 IL-6 생성량은 대조군을 100%로 하였을 때, 정상군이 2.4 \pm 0.3%, CSL50투여군에서 51.6 \pm 2.1%, CSL100투여군에서 37.4 \pm 2.4%로 CSL투여군에서 모두 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있게 감소하였다(Fig. 6).

(3) INF- γ 생성 억제 효과

HUVEC에서 LPS에 의해 유도된 INF- γ 생성량은 대조군을 100%로 하였을 때, 정상군이 40.3 \pm 2.6%, CSL50투여군에서 60.4 \pm 3.7%, CSL100투여군에서 61.9 \pm 2.9%로 CSL투여군에서 모두 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였다(Fig. 7).

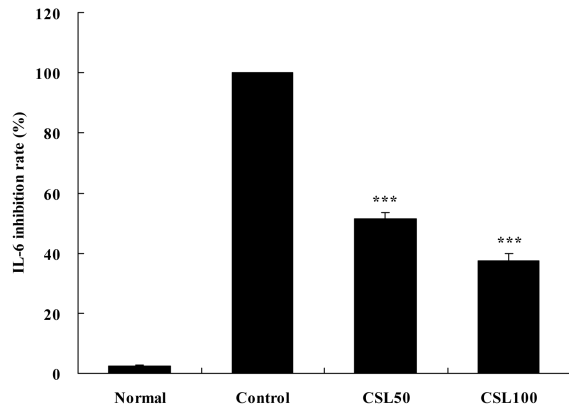


Fig. 6. Effects of CSL on levels of IL-6 in HUVEC.

The levels of IL-6 were determined using a Luminex system.

Normal : Only HUVEC, control : HUVEC and LPS (2 µg/ml), CSL50 : HUVEC and LPS and CSL 50 µg/ml, CSL100 : HUVEC and LPS and CSL 100 µg/ml

Values represent the means±SD of three experiment. Statistically significant value compared with control by *t* test (***) : $p < 0.001$.

CSL : *Caesalpinia sappan L.*, HUVEC : human umbilical vein endothelial cells, LPS : lipopolysaccharide

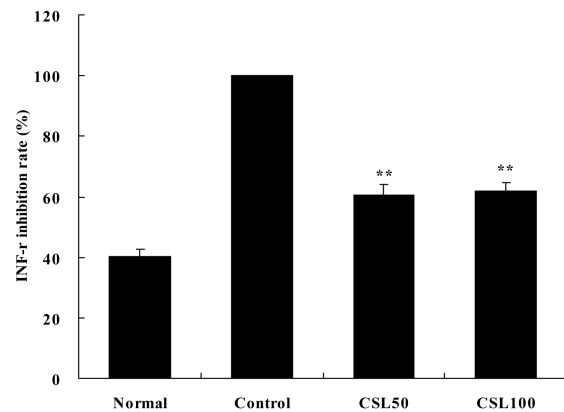


Fig. 7. Effects of CSL on levels of INF-γ in HUVEC.

The levels of INF-γ were determined using a Luminex system.

Normal : Only HUVEC, control : HUVEC and LPS (2 µg/ml), CSL50 : HUVEC and LPS and CSL 50 µg/ml, CSL100 : HUVEC and LPS and CSL 100 µg/ml

Values represent the means±SD of three experiments. Statistically significant value compared with control by *t* test (** : $p < 0.01$).

CSL : *Caesalpinia sappan L.*, INF : interferon, HUVEC : human umbilical vein endothelial cells, LPS : lipopolysaccharide

(4) TNF-α 생성 억제 효과

HUVEC에서 LPS에 의해 유도된 TNF-α 생성량은 대조군을 100%로 하였을 때, 정상군이 34.8±4.2%, CSL50투여군에서 63.5±0.8%, CSL100투여군에서 53.4±1.9%로 CSL투여군에서 모두 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있게 감소하였다(Fig. 8).

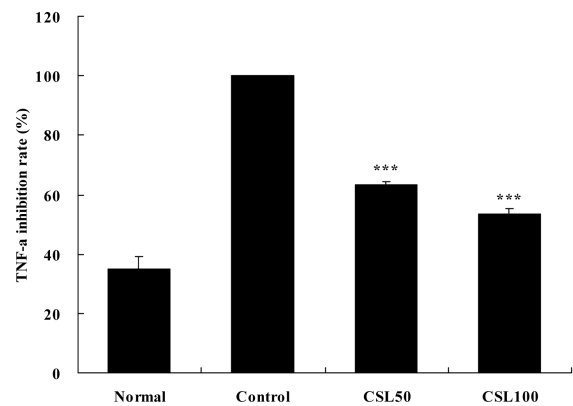


Fig. 8. Effects of CSL on levels of TNF-α in HUVEC.

The levels of TNF-α were determined using a Luminex system.

Normal : Only HUVEC, control : HUVEC and LPS (2 µg/ml), CSL50 : HUVEC and LPS and CSL 50 µg/ml, CSL100 : HUVEC and LPS and CSL 100 µg/ml

Values represent the means±SD of three experiments. Statistically significant value compared with control by *t* test (***) : $p < 0.001$.

CSL : *Caesalpinia sappan L.*, TNF : tumor necrosis factor, HUVEC : human umbilical vein endothelial cells, LPS : lipopolysaccharide

IV. 고찰

활성 산소는 인체의 생명 유지 과정에서 필연적으로 발생하는 물질로, 사용되는 산소량의 2~3%가 활성 산소로 전환되며 이러한 활성 산소는 반응성이 매우 높은 특징을 가지고 있다^{21,22}. 이렇게

생성된 활성 산소는 생체 내에서 산화적 손상(oxidative stress)을 유발하기 때문에 적절한 과정을 통하여 제거되어야 하나²³, 만약 제거되지 못하면 그 세포 또는 조직은 산화적 스트레스에 의하여 손상을 입게 되고 결국 사멸하게 된다²⁴.

산화적 손상은 노화와 관련이 크며, 체내 DNA 손상, 지질의 과산화로 인한 세포막의 손상, 단백질과 지질의 산화 등을 가져와 동맥경화, 암, 류마티스 관절염, 백내장, 노인성 치매 및 파킨슨씨병과 같은 질환 등을 유발시킨다¹.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 필연적으로 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등 외부물질에 노출되면 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응에 원인이 되는 많은 인자를 분비하게 됨으로써 염증반응을 가속시킨다²⁵. 염증반응이 지속되면 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환인 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암 등을 악화시키는 원인이 된다²⁶.

최근에 항산화 및 항염증을 위한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 단미제 연구는 菖蒲⁶, 土茯苓⁹, 川棟子¹⁰, 血竭¹¹, 羊蹄葉²⁷, 鬱金과 薑黃²⁸, 桃花²⁹ 등이 있고, 처방 연구는 托裏消毒飲⁷, 仙方活命飲⁸, 解熱湯¹², 調肝湯加減方¹³, 聖愈湯加減方¹⁴, 導氣湯³⁰ 등이 있으며, 약침제 연구는 枳殼¹⁵ 등이 있다. 이를 보면 항산화 및 항염증에 대한 연구는 피부과, 심혈관계, 부인과, 호흡기계, 소화기계 질환 등 여러 분야에서 시행 되었으며, 이는 산화적 손상 및 염증이 여러 질환의 발생에 대해 중요한 원인임을 알 수 있다.

蘇木(*Caesalpinia sappan L.*)의性は平 無毒하며, 味는 甘鹹하고, 心·肝으로 귀경하며, 活血破瘀, 消腫止痛하는 효능이 있어서 부인의 血氣에 의한 心腹痛, 無月經, 產後瘀血에 의한 脹滿疼痛 및 喘息, 痢疾, 破傷風, 癰腫, 打撲 充血에 의한 통증을 치료 한다^{16,36}. 蘇木의 약리작용으로는 황색포도상

구균을 포함한 여러 종류의 세균에 대한 항균 작용, 쥐와 토끼의 중추신경 억제작용, 혈관 수축과 같은 심혈관에 대한 작용 등이 있다³⁶.

蘇木에 대한 연구는 국내외에서 활발히 진행되고 있는데 항산화효과¹⁷⁻¹⁹, 항염효과²⁰, 항동맥경화 효과¹⁹, 위암세포주에 대한 세포독성 효과³² 및 항균효과³³ 등에 대한 보고가 있으나 세포를 이용하여 蘇木의 항산화 효과 및 HUVEC에서의 염증 유발인자에 미치는 영향에 관한 연구는 없었다.

이에 저자는 蘇木의 에탄올 추출물(CSL)을 사용하여 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서의 항산화 효과 및 항염증 효과를 검증하였고, 이를 바탕으로 사람의 혈관 내피 세포인 HUVEC에서 CSL의 항염증 효과에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

DPPH는 그 자체가 매우 안정된 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광 흡수성을 나타내는 보라색 화합물이다. 이 radical은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 특히 여러 가지 항산화 기작 중에 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다³⁴.

CSL의 항산화 활성에 미치는 영향에 대해 알아보려 DPPH의 소거활성을 측정하여 결과 농도에 따라 소거활성 효과가 증가하였다.

ROS는 세포 내에 존재하는 미토콘드리아, 퍼옥시좀, xanthine oxidase(XOD), NADPH oxidase 및 cyclooxygenase(COX)등의 효소들에 의해 생성되는 $\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $\cdot OH$ 등을 일컫는데, 이는 산화적 손상을 일으키는 주범이 된다. ROS 중 Superoxide radical은 산소를 이용하는 생체 내의 정상적인 대사과정에서 생성될 뿐만 아니라, 유기화합물들의 자동산화, 외부로부터 침입한 이물질에 대한 대식세포의 탐식작용 및 효소반응에 의하여 생성될 수 있다³⁵.

NO는 내피세포, 호중구 등에서 생성되며 L-arginine에서 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 citrulline

으로 전환 시에도 생성된다. 또한 NO는 대부분의 기관에서 intercellular messenger로서 작용하고 혈관의 항상성, 혈관 내피세포에 백혈구나 혈소판의 부착 억제와 혈소판 응집억제 및 신경전달 물질로서 작용한다³⁶. 아울러 면역계에서는 대식세포 및 미생물 방어에 관여하며 ROS와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite(ONOO-)를 생성하기도 한다^{37,38}.

CSL의 세포에서의 항산화 효과를 알아보기 위해 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 이용하였다. RAW 264.7 cell에서 CSL의 ROS 및 NO의 생성을 억제하는 효과는 농도가 증가함에 상승하였다. 위의 세 실험을 통해 CSL은 세포 내에서도 활성 산소를 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

대식세포는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 cytokine을 생산하여 감염 초기의 생체 방어에서 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다^{39,40}. 면역반응과 염증반응을 유도하는 염증매개 cytokine인 IL-1 β 는 다양한 lymphokine을 분비시켜 세포증식과 세포 외 기질 축적을 자극하고, IL-6는 숙주방어, 면역반응, 신경세포의 기능 등에서 중요한 기능을 하며, TNF- α 는 대식세포나 단핵세포에서 세포의 분화와 성장 등의 기능에 관여한다^{41,42}.

본 연구에서는 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에 LPS와 CSL을 함께 첨가하여 세포 사멸에 미치는 영향을 측정된 결과 세포 사멸이 정상군에 비해 CSL 투여군에서는 감소하는 것을 확인하였고, RAW 264.7 cell에 LPS의 의해 유도된 Cytokine 성분인 IL-6, MCP-1, TNF- α 생성억제 효과를 측정된 결과 CSL의 농도가 증가함에 따라 억제 효과가 증가함을 확인하였으며, 특히 CSL 40 μ g/ml 농도 투여군은 IL-6(p<0.001), MCP-1(p<0.05), TNF- α (p<0.001)에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2, 3, 4). 이 결과로 CSL은 LPS로 유도된 염증 유관인자로부터 세포를 보호하는 효과가 있으며, CSL에 의한 IL-6, MCP-1, TNF- α 생성억제 효과는 염증매개 cytokine의 생성 억제에도 효과가 있다는 것

을 확인할 수 있었다.

최근 혈관질환으로 혈관에서의 염증반응에 대한 관심이 높아지고 있다. 정상 혈관은 내피세포와 평활근세포로 이루어져 있는데 염증세포와의 상호작용이 일어나지 않는다. 그러나 혈관이나 혈관벽 내에 염증이 발생하였을 경우에는 염증세포가 혈관벽에 달라붙기 시작한다. 염증반응이 지속되면 혈관벽의 내피 세포에서 adhesion molecule이라고 지칭되는 VCAM-1, ICAM-1 등이 발현하게 되고, 이들이 염증세포에 있는 integrin이라는 수용체와 상호작용을 하게 된다. 이는 염증세포와 혈관내피와의 매우 강한 결합을 유도하여 염증세포가 더 이상 혈관 위를 굴러가지 않고 혈관벽 위에 강력하게 달라붙게 된다. 염증세포를 유도하여 혈관 내로 이동시키는 물질은 cytokine의 일종이며 이러한 염증기작에 의한 혈관의 손상이 각종 동맥경화증이나 심부전과 같은 질환에 결정적 요인이 될 수 있다⁴³⁻⁴⁵.

CSL에 대한 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서의 항염증 효과를 바탕으로 사람의 혈관 내피 세포인 HUVEC에서의 항염증 효과를 알아보았다.

먼저, MTT assay를 수행한 결과, CSL의 적정농도 범위 내에서는 HUVEC의 생존율에 크게 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. HUVEC에서 LPS에 의해 유도된 Cytokine 성분인 IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α 생성억제 효과를 측정된 결과 모든 CSL의 투여군은 IL-1 β (p<0.001), IL-6(p<0.001), INF- γ (p<0.01), TNF- α (p<0.001) 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5, 6, 7, 8). 이의 결과로 CSL의 IL-6, MCP-1, TNF- α 생성억제 효과는 염증매개인 cytokine의 생성 억제에도 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 실험 결과 CSL은 DPPH의 소거 활성효과가 있음을 확인하였으며 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서의 ROS 및 NO의 활성 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 그와 함께

RAW 264.7 cell에서의 IL-6, MCP-1, TNF- α 생성 억제 효과를 확인하여 이를 통해 CSL은 세포 내에 생성되는 항산화 및 항염증에 효과가 있을 것으로 사료되며, 이를 바탕으로 활성 산소 및 염증성 질환인 류마티스 관절염, 암 등에 효과가 있을 것이다.

그리고 CSL은 RAW 264.7 cell 뿐만 아니라 사람의 혈관 내피 세포인 HUVEC에서의 IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α 생성억제 효과가 있음을 확인하였으며 이는 혈관 염증성 질환 등에도 적용할 수 있을 것이다.

최근 항산화 및 항염증의 연구가 피부과, 산부인과, 심혈관계, 호흡기계 등 여러 분야에서 연구가 이루어지고 있으니 蘇木 또한 지속적인 후속 연구를 통해 여러 방면의 응용도 생각해볼 수 있다.

V. 결론

蘇木의 항산화 효과 및 RAW 264.7 cell과 HUVEC에서 LPS로 유도된 항염증 효과에 대한 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CSL이 가진 DPPH 소거 활성을 측정된 결과 농도 의존적으로 소거 활성을 증가시켰다.
2. CSL이 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 ROS 및 NO 생성 억제를 농도 의존적으로 증가시켰다.
3. CSL이 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 염증 Cytokine 성분의 생성 억제를 농도 의존적으로 증가시켰으며, 특히 CSL 40 μ g/ml에서 유의성 있게 증가시켰다.
4. CSL이 LPS로 유도된 HUVEC의 염증 Cytokine 성분의 생성 억제를 유의성 있게 증가시켰다.

이러한 蘇木의 항산화 및 항염증 효능은 蘇木을 활용한 염증성 질환의 예방 및 면역치료 약물의 개발 가능성을 제시한다.

참고문헌

1. 정일민, 김광호, 안종국. 한국 약용 및 식용식물들의 항산화성. 한국약용작물학회지 1998;6(4):311-22.
2. De Nardin E. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann Periodontol* 2001; 6(1):30-40.
3. 박광균. 구강생화학. 서울: 군자출판사; 1999, p. 318-25.
4. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420(6917):846-52.
5. Ludwig JW, Richard ML. Targeting the secretory pathway for anti-inflammatory drug development. *Curr Top Med Chem* 2006;6(2):165-78.
6. 범희주, 은종방, 최지영, 이승철, 이지범. 창포의 항산화 활성 및 항균, 항염증작용이 피부에 미치는 영향. 대한피부과학회지 2007;45(2s):203-4.
7. 이상문, 홍승욱. Mouse cell에서 托裏消毒飲의 항산화작용과 항염증 효과. 대한외관과학회지 2007;20(3):43-50.
8. 박민철, 홍승욱. Mouse cell에서 仙方活命飲의 항산화작용과 항알러지 및 항염증 효과. 대한외관과학회지 2008;21(2):46-53.
9. 이창현, 이효승, 김재은, 허숙경, 차창민, 원찬욱 등. 혈관내피세포에서 土茯苓의 항산화 및 항염증 효과. 대한본초학회지 2009;24(3):39-50.
10. 이효승, 허숙경, 윤현정, 김병완, 박선동. 마우스 대식세포에서 川棟子의 항산화 및 항염증 효과. 대한본초학회지 2008;23(4):121-34.
11. 이효승, 허숙경, 윤현정, 최재우, 정재하, 박선동. 마우스 대식세포에서 血竭의 항산화 및 항염증 효과. 대한본초학회지 2008;23(2):179-92.
12. 곡정강, 김진주, 노영래, 이성현, 정승연, 정희재 등. 解熱湯의 항염증, 항산화, 항노화 작용에 대한 실험적 연구. 대한한방내과학회지 2007;28(4)

- :671-80.
13. 변형국, 유동열. 調肝湯加減方の 抗酸化活性 및 抗炎症作用에 대한 實驗的 研究. 대한한방부인과학회지 2008;21(2):76-96.
 14. 김의일, 유동열. 聖愈湯加減方の 항염증 및 항산화. 대한한방부인과학회지 2008;21(4):69-89.
 15. 김성진, 박상균. 지각 약침액의 항산화 및 항염증 효과에 관한 연구. 대한경락경혈학회지 2010; 27(2):13-24.
 16. 전국한의과대학본초학교수 공편저. 본초학. 서울: 영림사; 2004, p. 479-80.
 17. 임대관, 최웅, 신동화. 소목 추출물의 항산화 효과. 한국식품과학회지 1996;126(1):77-82.
 18. 권형준, 정우희, 박혜란, 신동화, 조성기. 감마선 조사에 의한 소목 추출물의 색상변화 및 항산화 활성 평가. 한국식품영양과학회지 2007;36(8):1055-61.
 19. 이창섭. 항산화작용과 ACE저해활성 및 HUVECs 내 VCAM-1의 발현저해에 미치는 蘇木의 항동맥경화효과에 대한 연구. 동국대학교 대학원 2007.
 20. Jeong IY, Jin CH, Park YD, Lee HJ, Choi DS, Byun MW, et al. Anti-inflammatory Activity of an Ethanol Extract of *Caesalpinia sappan* L. in LPS-induced RAW 264.7 Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008;13(4):253-8.
 21. 이상옥, 김민정, 김동균, 최현주. 차가버섯의 온도단계별 물추출물의 항산화성 비교. 한국식품영양과학회지 2005;34(2):139-47.
 22. 조숙현, 최용조, 노치웅, 최철웅, 김덕송, 조성환. 대나무 수액의 활성 산소 소거활성과 세포독성. 한국식품저장유통학회지 2008;15(1):105-10.
 23. PaPa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 1997;174(1-2):305-19.
 24. Slavić M, Appiah I, Nikolić-Kokić A, Radojčić R, Jones DR, Spasić MB, et al. The anti-oxidative defence system in the isolated rat uterus during spontaneous rhythmic activity. *Acta Physiol Hung* 2006;93(4):335-9.
 25. 이용숙, 장선일. 金銀花와 黃芩이 배오된 처방제의 항염증 효과 연구. 대한한의학방제학회지 2010;18(1):121-32.
 26. 곡정강, 정승기, 정희재, 김진주. 連翹의 LPS로 유도된 RAW 264.7 Cell에서의 항염증 효과. 대한한방내과학회지 2010;31(2):242-53.
 27. 조현진, 윤현정, 박선동. 羊蹄葉 메탄올 추출물의 항산화 및 항염증 효과. 대한본초학회지 2011; 26(1):87-96.
 28. 오혜인, 박한별, 주미선, 정선용, 오명숙. 鬱金과 薑黃의 항산화 및 항염증 활성 비교연구. 대한본초학회지 2010;25(1):83-91.
 29. 이진영, 안봉전. 도화(桃花)의 항산화 및 항염증 활성. *Agr Chem Biotechnol* 2010;53(3):162-9.
 30. 김동완, 윤현정, 허준영, 김태훈, 조현진, 박선동. 마우스 대식세포에서 導氣湯 메탄올 추출물의 항산화 및 항염증 효과. 대한본초학회지 2010; 25(4):103-12.
 31. 김창민 외 역. 중약대사전. 서울: 도서출판 정담; 1999, p. 2420-3.
 32. Park KJ, Kim EH, Eun YA, Kang BJ, Sung HJ. Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines. *Kor J Pharmacogn* 1997;28(4):233-8.
 33. 이성규. 가축질병 균주에 대한 소목의 항균활성. 한국미생물·생명공학회지 2003;31(3):242-9.
 34. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 1958;181:1199-200.
 35. 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(11):5338-42.
 36. Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide

- synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(8):1873-81.
37. Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 2003;140-1, 113-24.
 38. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411(2-3):385-400.
 39. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Acute and chronic inflammation : Mitchell S. Pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co; 2006, p. 47-86.
 40. Byun SH, Yang CH, Kim SC. Inhibitory effect of Sctophulariae Radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and Nitric Oxide production in lipoposaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Kor J Herbology* 2005;20(2):7-16.
 41. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Innate immunity: Tenney S. Kuby Immunology. 6th ed. New York: Freeman press; 2007, p. 52-73.
 42. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 2003;37:355-61.
 43. Bouhlef 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* 2008; 263(1):28-42.
 44. Li JJ, Zhu CG, Yu B, Liu YX, Yu MY. The role of inflammation in coronary artery calcification. *Ageing Res Rev* 2007;6(4):263-70.
 45. 한기훈. 이상지질혈증, 염증과 죽상동맥경화. 심장과 혈관 2004;6(3):6-13.