

판람근의 지질과산화 및 저밀도지단백산화에 미치는 영향

장현진 · 양기숙*

숙명여자대학교 약학대학

(Received October 16, 2002; Revised November 19, 2002)

Effects of *Isatis indigotica* on Anti-lipid Peroxidation and Low Density Lipoprotein Oxidation

Hyun-Jin Jang and Ki-Sook Yang*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — *Isatis indigotica* is commonly used as traditional chinese medicine for antipyretic, antiviral, and detoxifying purpose in China. In order to examine whether it prevents lipid peroxidation, root of *Isatis indigotica* was extracted with methanol and fractionated with hexane, ethyl acetate, butanol and water. The activity was evaluated by DPPH method and lipid peroxidation in rat liver homogenate and Cu^{++} -induced oxidated LDL. The results showed that ethyl acetate fraction and indigo, which is known as its constituent, had significantly anti-lipid peroxidative effects.

Keywords □ *Isatis indigotica*, lipid peroxidation, LDL oxidation

판람근(*Isatis Radix*, 板藍根)은 십자화과 *Cruciferae*에 속하는 송람(菘藍)*Isatis indigotica*의 뿌리로서 중국에서 급만성 간염이나 각종 호흡기 염증, 암 등에 경구, 주사 또는 피부질환에 외용제로 이용되고 있다.^{1,2)}

판람근의 성분으로는 indigo, indigotin, indirubin, β -sitosterol 과 2-hydroxyl-3-butenyl thiocyanate, epigoitrin, adenoside, amino acids, (*E*)-3-(3,5'-dimethoxy-4'-hydroxybenzylidene)-2-indolinone, 4-(4-hydroxy-3',5'-dimethoxyphenyl)-3-buten-2-one, 3-(2-carboxyphenyl)-4(3*H*)-quinazolidone이 있으며, syringic acid, 2-aminobenzoic acid, benzoic acid, salicylic acid 및 qingdainone이 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 약리작용으로는 Jingke68-1 influenza 항바이러스작용, 항균작용,⁴⁾ 및 일본뇌염, 수두, 간염에 대한 치료작용이 보고 되었다.⁶⁾ 판람근의 색소성분인 indigo와 indirubin은 천연색소로서 항종양 효과,⁷⁾ 만성 골수구성 백혈병의 치료,⁸⁾ 지연성 과민 증상에 대해 항염작용⁹⁾ 다당체의 면역증강작용이 보고되었다.¹⁰⁾ 이와같이 판람근이 항암, 항염 등에 사용되고 있으므로 세포 및 지질의 산화에 미치는 영향을 측정하고자 하였다.

본 실험에서는 판람근의 MeOH Ex와 각 분획들의 자유기 소거작용, 지질과산화에 미치는 영향을 측정하고자 흰쥐의 간을 이용한 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서의 지질과산화 억제작용 및 동맥경화 유발인자¹¹⁾로 알려진 LDL 산화에 미치는 영향을 검토하였다.

실험방법

실험재료 - 판람근은 중국 북경 동인당약점에서 판매하고 있는 정부 규격품을 현지에서 구입하였으며 확증표본(SMP 99021)은 숙명여자대학교 생약표본실에 보관되어 있다.

실험동물 - 체중 200 ± 20 g의 Sprague-dawley계 웅성 흰쥐를 일주일이상 동일 조건하에서 사육하여 동물실 환경에 적응시켰으며, 동물실 온도는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 10\%$ 로 유지하였고, 실험기간 동안 삼양유지(주)의 고형 사료와 상수는 충분히 공급하였다.

시약 및 기기 - 추출 및 분획용 시약은 1급 용매를 사용하였으며, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다. 기기는 UV/VIS spectrophotometer(JASCO J-530, Japan), Ultra Centrifuge(Beckman L7-55, Rotor type : Ty-42.1, U.S.A)를 사용하였다.

추출 및 분획 - 세절한 판람근(600 g)을 MeOH로 4시간씩 3회 가운 추출 후 은시 여과하고 여액을 감압 농축하여 MeOH 엑스(132.0 g)를 얻었다. 이 MeOH Ex를 계통적 추출 방법에 의하

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9578 (팩스) 02-710-9578
(E-mail) ksyang@sdic.sookmyung.ac.kr

여 Hexane 분획(61.8 g), EtOAc 분획(6.6 g), BuOH분획(30.0 g), H₂O 분획(501.6 g)을 얻었으며 감압농축하여 시료로 사용하였다.

EtOAc 분획은 Indigo(Fluka Chemical Co.)와 함께 CHCl₃:MeOH = 7:3을 전개용매로 TLC를 실시한 결과 같은 Rf치를 나타내는 청색의 spot를 확인하였다.¹²⁾

DPPH 라디칼 소거활성 검색¹³⁾ - 시료 메탄올용액(100 μl)에 0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액(99.5% methanol에 용해) 1.9 ml을 가한 후 진탕기로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였으며 비교약물로 ascorbic acid를 사용하였다.

지질과산화 억제작용 측정 - 흰쥐를 ether로 가볍게 마취시키고 해부하여 간 문맥을 통하여 빙냉시킨 0.15 M KCl 용액을 관류시켜 간 내의 혈액을 제거하고 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 신속히 간 조직 1g을 취하고 차가운 KCl을 가하여 10 ml이 되도록 하여 세절한 후 얼음욕에서 균질화하였다. 간 균질액 중의 단백질 농도는 소 혈청 알부민을 표준물질로 하는 Lowry's method에 의해 결정하였다.¹⁴⁾

TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)비색정량법 : 농도별로 조제한 각 시료 100 ml에 간 균질액(3 mg protein), 10 mM FeSO₄ 용액 20 μl, H₂O₂ 50 μl, H₂O 30 μl를 넣고 0.1 M phosphate 완충액을 가하여 전체 부피가 1 ml이 되도록 vortex mixer로 혼화하여 37°C 수욕 상에서 20분 동안 흔들여주면서 배양하여 지질과산화를 유발하였다.¹⁵⁾ 50 mM BHT(butylated hydroxytoluene) 용액 40 μl를 가하여 산화를 정지시킨 후, 생성된 과산화지질에 TBA(thiobarbituric acid)액 2.0 ml를 각각 가하고 95°C에서 3~10분간 가열하여 발색시키고 3000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상정액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

LDL산화에 대한 작용 측정 - LDL의 분리 및 정제 : 사람의 혈장에 aprotinine 0.002%, EDTA, Na₂S₂O₃를 0.05%씩 가하여 천천히 혼합한 후 KBr를 가하여 밀도(d=1.006→1.025)를 조정하여 1차 초원심분리 하였다 (40,000 rpm, 4°C, 16 hr). 이때 분리된 VLDL을 제거하고 LDL이 포함된 부분을 취한 후 KBr를 가하여 밀도(d=1.026→1.055)를 조정하여 2차 초원심분리(40,000 rpm, 4°C, 24 hr)한 후 LDL을 분리하였다.¹⁶⁾ 분리한 LDL을 pH 7.4의 인산완충생리식염액 (PBS)으로 4°C에서 48 시간 동안 투석하여 정제하였다. 단백질 농도는 소 혈청 알부민을 표준물질로 하는 Lowry's method¹⁴⁾에 의해 결정하였다.

Cu²⁺에 의해 유도된 LDL 산화 : LDL(400 μg protein), 1 mM CuSO₄ 16 μl, PBS 완충액에 녹여 농도별로 조제한 각 시료 100 μl에 PBS 완충액(pH 7.4)를 섞어 전체 부피가 1 ml이 되도록 하였다. Vortex mixer로 혼화하여 37°C의 진탕 수욕조서 4시간 동안 배양하여 산화시킨 후 1 mM EDTA 20 μl를 첨가하여

산화를 중지시켰다.¹⁷⁾

TBARS 비색정량법 : 상기 방법으로 산화시킨 후 LDL 반응액에 25% TBA를 넣어 단백질을 침전시킨 후 그 상정액에 1% thiobarbituric acid를 첨가하여 95°C에서 발색시킨 후 냉각시켰다. 2500 rpm에서 20분간 원심분리한 후 생성된 MDA (malondialdehyde)의 양을 532 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.¹⁸⁾ 양성 대조 약물은 ascorbic acid를 농도별로 용시 조제하여 사용하였고, 각 시료의 LDL 지질과산화 억제효과를 비교검토하기 위해서 Cu²⁺에 의해 유도되는 과산화 지질의 생성을 50% 억제하는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)를 측정하였다.

통계학적 분석 - 모든 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며 자료분석은 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

실험결과 및 고찰

유리기 소거활성 - 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾ 판람근의 MeOH Ex.와 각 분획의 유리기 소거작용은 Table I에서와 같이 EtOAc 분획과 BuOH 분획에서 활성을 나타내었다. 판람근의 성분으로 알려진 indigo는 ascorbic acid와 유사한 항산화 활성을 나타내었다.

지질과산화에 미치는 영향 - 활성산소 특히 수산화 유리기(OH)는 그 반응성이 매우 강하기 때문에 생체막의 지질과 반응하여 과산화지질을 형성하고 DNA, 단백질, 효소와 반응하여 생체조직의 손상, 병변을 야기시키는 것으로 알려져 있다. 정상적인 흰쥐의 간 균질액에 Fe²⁺/H₂O₂를 첨가하여 지질과산화를 촉진시키고 판람근의 MeOH Ex.와 각 분획을 일정농도로 가하여 지질과산화에 미치는 영향은 Table II와 같다. 이 중 활성이 강한

Table I - The radical scavenging effect of *Isatis indigotica* on DPPH Method

Group	IC ₅₀ (mg/ml) ^a
Ascorbic acid	7.32 × 10 ⁻³
Indigo	9.82 × 10 ⁻³
MeOH ex.	1.26
Hexane fr.	0.61
EtOAc fr.	0.27
BuOH fr.	0.62
H ₂ O fr.	0.95

MeOH solution of varying sample concentrations was added to 1.9 ml 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. methanol solution (0.1 mM). The optical density was measured at 515 nm.

^a: Amount required for 50% reduction of 0.1 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

Table II – Anti-lipidperoxidation effects of *Isatis indigotica* on rat liver homogenate *in vitro*

Group ^a	Malondialdehyde (nmol/mg protein)
Control	19.5 ± 1.65
MeOH ex.	17.9 ± 1.27
Hexane fr.	2.0 ± 0.40**
EtOAc fr.	2.1 ± 0.13**
BuOH fr.	10.2 ± 1.05
HsO fr.	18.1 ± 0.14

MeOH ex. and its solvent fractions were tested. Lipid peroxidation was induced by Fe⁺⁺+H₂O₂ system and determined with thiobarbituric acid reactive substances.

^a: Each sample concentration is 400 µg/ml. Each value represents the mean ± S.E. (n=5), Significantly different from control, **: P < 0.001.

Table III – Effects of hexane and EtOAc fractions of *Isatis indigotica* on lipid peroxidation *in vitro*

Group	Malondialdehyde(nmol/mg protein)			
	12.5	25	100	200(µg/ml)
Control	19.4 ± 1.65			
Silymarin	5.4 ± 0.03**			
Hexane fr.	19.3 ± 0.27	18.3 ± 0.19	14.8 ± 0.46*	10.7 ± 1.02*
EtOAc fr.	19.5 ± 0.43	12.8 ± 0.63*	2.2 ± 1.24**	2.0 ± 0.21**

Lipid peroxidation was induced by Fe⁺⁺+H₂O₂ system and determined with thiobarbituric acid reactive substances.

Each value represents the mean ± S.E. (n=5), Significantly different from control, *: P < 0.01, **: P < 0.001

hexane 분획 및 EtOAc 분획에 대하여 지질과산화 저해작용을 측정하였다. 그 결과 Table III에서와 같이 hexane분획은 100 µg/ml, EtOAc분획은 25 µg/ml 이상에서 유의적인 지질과산화 억제 활성을 나타내었으며 EtOAc분획 100 µg/ml, 및 200 µg/ml에서는 비교약물인 silymarin보다 우수한 활성을 나타내었다.

LDL 산화에 미치는 영향 – 정상인 경우에는 LDL 입자는 인체 내 cholesterol의 조절 및 대사에 직접 관여하며^{20,21)} LDL이 과도하게 존재하거나, 다른 요인에 의해 LDL이 산화적 변이가 되면 죽상경화증과 깊은 관련이 있으며 특히 동맥경화로 인한 심장질환의 발병에 중요한 위험인자로 작용하고 있다.²²⁾ LDL의 산화적 변이는 과산화 지질의 증가(TBARS activity의 증가)와 표면 음전하의 증가(electrophoretic mobility)에 의해 평가될 수 있다고 보고되어 있다.²³⁾ 본 실험에서는 판람근의 methanol Ex. 및 각 분획들의 LDL 산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 LDL에 각 시료를 농도별로 가하고 Cu²⁺에 의해 산화를 유발시킨 후, TBARS 비색정량법으로 지질과산화 억제작용을 측정하여 Table IV와 같다. MeOH Ex.와 각 분획에서의 LDL의 지질과산화 억제활성은 EtOAc 분획에서 역시 강한 활성을 나타내었으며 Indigo는 IC₅₀ 9.82 µg/ml로 ascorbic acid 7.32 µg/ml와 비슷한 지질과산화 억제활성을 나타내었다.

Table IV – Effects of *Isatis indigotica* on Cu²⁺-induced LDL lipid peroxidation

Group	IC ₅₀ (µg/ml)
Ascorbic acid	0.4
Indigo	5.9
MeOH ex.	33.7
Hexane fr.	41.1
EtOAc fr.	17.4
BuOH fr.	22.3
H ₂ O fr.	18.7

Low density lipoprotein was incubated with Cupric sulfate in the MeOH ex. and its fractions. The extent of lipid peroxidation was measured by determining the quantity of thiobarbituric acid reactive substances and expressed as required sample concentration (µg/ml) for 50% inhibition of Cu²⁺-induced LDL(mg protein) lipid peroxidation.

결론

판람근 *Isatis indigotica*의 MeOH Ex. 및 hexane분획, EtOAc 분획, BuOH 분획, H₂O분획, 색소인 Indigo에 대하여 항산화 및 지질과산화에 미치는 영향을 측정한 결과는 다음과 같다.

1. DPPH 법에 의한 유리기 소거작용은 EtOAc 분획과 BuOH 분획에서 활성을 나타내었으며, indigo는 강한 항산화 작용을 나타내었다.

2. 지질과산화 억제작용은 hexane 분획과 EtOAc 분획에서 억제작용이 있었고, 특히 EtOAc 분획은 양성 대조약물로 사용한 silymarin과 유사한 억제활성을 나타내었다.

3. Cu²⁺로 유도된 LDL에서의 지질과산화 억제작용은 EtOAc 분획과 색소성분인 indigo에서 우수한 억제활성을 나타내었다.

이상의 결과로, 판람근의 EtOAc 분획이 우수한 항산화 활성이 있음을 규명하였고 색소성분으로 알려진 indigo도 강한 항산화작용을 나타냄을 확인하였으며 EtOAc 분획에 대하여는 활성 성분을 규명하고자 한다.

감사의 말씀

이 논문은 2001년도 숙명여자대학교 교비연구비의 지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) 本草綱目通譯編輯委員會：本草綱目通譯，學苑出版社，中國 北京 p. 793 (1992).
- 2) 中華人民共和國衛生部：中藥彩色圖集，廣東科機出版社，中國 廣州 p. 19 (1990).

- 3) Huang, Q. S., Yoshihira, K. and Natori, S. : Isolation of 2-hydroxyl-3-butenyl thiocyanate epigoitrin and adenoside from 'Banlangen', *Isatis indigotica root*. *Planta Medica* **42**, 308 (1981).
- 4) 袁素康 : 常用中藥成分與藥理手冊. 中國醫藥科機出版社. 北京. p. 1178 (1994).
- 5) Wu, X. Y., Liu, Y. H., Sheng, W. Y., Sun, J. and Qin, G. W. : Chemical constituents of *Isatis indigotica*. *Planta Medica* **63**, 55 (1997).
- 6) Wang, Y. S. : Pharmacology and Applications of Chinese Material Medica, Harwood academic publishers. Netherlands p. 185 (1998).
- 7) 劉學安, 彭明 : 抗癌中藥藥大辭典, 湖北科學技術出版社. 中國 湖北 p. 604 (1994).
- 8) Li, C. X. and He, W. G. : Leukogenic effect of complex indigo powder. *J. Ethnopharmacol.* **36**, 183 (1992).
- 9) Kunisata, T., Tatefuji, T. and Age, H. : Indirubin inhibits inflammatory in delayed-type hypersensitivity. *Eur. J. Pharmacol.* **410**, 93 (2000).
- 10) Xi, Y. M. and Lu, P. C. : Experimental studies on immunostimulate effect of the *Isatis indigotica* polysaccharide. *Chung Hsi Chieh Ho Tsa Chih.* **6**, 357 (1991).
- 11) Luc, G. and Fruchart, J. C. : Oxidation of Lipoproteins and atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 206 (1991).
- 12) 陳慶雲 : 常用中藥藥有效成分含量測定. 人民衛生出版社. 中國 北京 p. 378 (1997).
- 13) Inakeda, N. and Fukuzume, K. : Tocopherols as anti-oxidants in oxidation of methyl linolate. *J. Japan Oil Chem. Soc.* **26**, 343 (1977).
- 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 15) Buege, J. A. and Aust, S. D. : Microsomal lipidperoxidation, *Meth. Enzymol.* **52**, 302 (1978).
- 16) Converse, C. A. and Skinner, E. R. : Lipoprotein analysis, A practical approach, Oxford university, New York p. 113 (1992).
- 17) Choi, J. H., Park, Y. J., Son, H. S., Yang, K. S. and Kim, T. W. : Functional properties of modified low density lipoprotein and degradation of modified LDL by human monocyte macrophage. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **24**, 362 (1995).
- 18) Hui, C. C., Jing, R. T. and Shyh, M. S. : Increase of oxidizability of plasma LDL from patients with coronary artery disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **125**, 200 (1994).
- 19) 皆川信子 : 活性酸素が關與する代表的疾患. *ファルマシア* **29**, 1029 (1993).
- 20) Choi, J. H., Son, H. S. and Kim, T. W. : Fatty acid composition and functional properties of low density lipoprotein and oxidized LDL from human plasma. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**, 402 (1994).
- 21) Chen, G. C., Hardman, D. A., Hamilton, R. L., Mendel, C. M., Schilling, J. M. and Kan, J. P. : Distribution of lipid binding regions in human apo B-100. *J. Biochem.* **28**, 2477 (1989).
- 22) Nagatoshilde, Audowin, B. N. and Benjamin, H. S. L. : Aged galic extract and its constituents inhibit Cu²⁺-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Medica* **63**, 263 (1997).
- 23) Ishwarlal, J., Edward, P. N., Louis, C. and Scott, M. G. : β -Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* **1086**, 134 (1991).