

송지의 세포독성과 항산화작용 및 arachidonic acid 생성 억제작용

조경미 · 석귀덕*

대구가톨릭대학교 약학대학

(Received July 18, 2002; Revised September 17, 2002)

The Inhibitory Action of Free Radical and Arachidonic Acid Production and Cytotoxic Effects of Pini Resina

Kyong Mi Cho and Kui Duk Suk*

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Kyungsan 712-702, Korea

Abstract — In this report, anti-inflammatory, analgesic and cytotoxic effects of the water extracts of Pini Resina, which has been as an additive to oral hygienic products together with sodium chloride in community, were investigated. The water extracts of Pini Resina, pretreated Pini Resina and Ramus Mori Albae-added Pini Resina all showed relatively low cytotoxicity. All samples showed concentration-dependent increase in electron-donating capacity to DPPH, especially, Ramus Mori Albae-added Pini Resina was the highest in the extent. Arachidonic acid release from the cell membrane was significantly inhibited by the presence of the samples above, among those, Ramus Mori Albae-added Pini Resina was the most effective in the inhibitory action of the release.

Keywords □ Pini Resina, inhibitory action of free radical and arachidonic acid production, cytotoxic effects

치주질환은 구강질환 중 성인에서 가장 빈발하는 감염성 질환으로 치은염과 치주염으로 대표될 수 있다. 치주질환의 가장 큰 요인이 치은연하 낭에 존재하는 세균성 치태임이 밝혀진 후, 치은염과 치주염의 발생, 진행에 관계하는 미생물들에 관해서 많은 연구가 되어졌다.^{1,2)} 치태와 치석 등의 국소적인 요인과 영양장애, 약물작용, 임신, 내분비장애, allergy, 유전적·정신적 요인 등의 전신적 요인으로 인해 치은염이 발생되고,³⁾ 세균요인의 변화, 치은 열구액의 증가, 출혈, 산화·환원 전위의 감소 등 환경요소의 변화로 인해 치주염의 상태로 진전되는 결과를 가져온다.⁴⁾

염증 발생 조직 주위에는 다형핵 백혈구가 집중되어 다른 면역세포를 운집시키고 이들 세포에 의해 과량의 reactive oxygen species(ROS)가 생산, 분비된다.⁵⁾ ROS에 의해 세포막의 변화가 일어나 세포 내로 Ca²⁺의 유입이 증가하게 되면, 이것을 촉매로 phospholipase A₂(PLA₂)가 활성화되면서 시작된다. 활성화된 PLA₂에 의해 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리되는데, arachidonic acid는 C-20인 불포화 지방산으로 cyclooxy-

genase(COX)에 의해 prostaglandin(PG)으로, lipoxygenase에 의해 leukotriene(LT)으로 전환된다. PG와 LT는 염증과 면역 반응에서 주요 역할을 한다.⁶⁾

한편, 송지(松脂)는 소나무과(Pinaceae) Pinus속 식물의 줄기에 상처를 내서 삼출하는 balsam(생송지(生松脂), 송향(松香), Pini Resina, Resina Pini, Terebinthina, Pini Oleo-Resina, Colophonium)을 방치하여 휘발성분을 자연히 증발시킨 수지로서 황색에서 갈색의 덩어리로 성분은 수지가 대부분이고 약간의 정유를 함유하며, 피부자극약으로 경고 또는 반창고 등의 원료로 사용되고 공업용으로도 널리 사용되고 있다.⁷⁾ 상지(桑枝, Rhamus Mori Albae)는 뽕나무(*Morus alba* L.)의 어린 가지를 건조한 것으로 한방에서는 풍습관절통치료제, 항고혈압약, 이뇨제로 사용한다. 성분으로는 dihydrokempterol, mulberochromene, mulberrin, cyclomulberochromene, dihydromorin, maclurin, morin 등을 함유한다.⁸⁾

최근에는 치주질환 예방·치료 물질을 천연물로부터 얻고자 하는 노력이 시도되고 있다.^{9,10)} 따라서 본 연구는 치약이나 양치용액에 첨가할, 효과적인 치주질환 예방·치료 물질을 찾아내기 위해 민간에서 사용해오고 있는 송지와 정제송지, 항염증작용이 있다고 알려진 상지¹¹⁾를 가한 송지의 수추출물의 세포독성

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-850-3614 (팩스) 053-850-3602
(E-mail) kdsuk@cataegu.ac.kr

과 항염증·진통작용에 대하여 실험하였기에 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 - 송지(松脂)는 중국산울, 상지(桑枝)는 국내산을 대
구에서 구입하여 실험에 사용하였다.

시료의 조제 - 정제송지는 생송지 20 g을 먼거즈에 싸서 증류
수 500 ml에 넣고 끓여 거즈 사이로 빠져나온 것을 차가운 물에
저칼질시켜서 사용하였다. 상지加송지는 생송지와 상지를 20 : 3
의 비율로 혼합하여 증류수 500 ml에 넣고 끓인 후 정제송지와
같이 처리하였다.

분비된 송지, 정제송지, 상지加송지 20 g씩에 증류수 500 ml
을 넣고 90°C에서 5시간 환류추출한 후 Whatman® 2 filter로 여
과하고 4,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 상층액을 취하였
다. 이 액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)로 60°C
수욕상에서 감압농축한 후 freeze dryer(MAXI-Dry Lyo,
Denmark)로 동결건조하였다. 각 생약제의 수득율은 송지 1.4%,
정제송지 0.7%, 상지加송지 2.2%이었다. 동결건조하여 가루상태
가 된 시료를 0.5% DMSO용액에 녹여 syringe filter(0.22 µm,
Gelman lab)로 여과멸균하여 사용하였다.¹²⁾

세포주 및 세포배양 - human monocytic macrophage(KCLB
21533)인 U937을 한국세포주은행(서울)에서 분양받아서 사용하
였다. RPMI medium 1640에 10% FBS(Fetal bovine serum),
1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 배양액으로 하였으며, 세
포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 기타 실험에 사
용된 배지는 FBS를 5% 첨가하여 사용하였다.¹³⁾

MTT 검색법 - 96-well plate에 well당 2×10⁴의 세포를 9개
의 well에 각각 첨가하고 1개의 well에는 세포부유액 대신 배지
만을 가해 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. 0.5% DMSO용액
에 녹인 시료용액은 원하는 농도의 10배 용액으로 만들어 PBS
로 희석하여 8가지 농도로 20 µl/well씩 첨가하였고 세포부유액
을 넣은 마지막 well에는 시료 대신 PBS를 첨가하여 100% 생
존군으로 삼았다. 검체 투여가 끝난 plate를 37°C, 5% CO₂
incubator에서 48시간 배양한 후 2 mg/ml MTT(3-(4,5-dime-
thylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 50 µl/
wel를 가하고 다시 4시간 배양하였다. 배양 종료시 3,000 rpm
에서 5분간 원심분리한 후 배지를 제거하고 DMSO(Dimethyl
sulfoxide) 150 µl/well을 가하여 formazan결정을 녹이고 균일하
게 만든 다음 ELISA reader(EL×808, U.S.A)로 OD₅₄₀값을 측
정하였다. 대조군과 비교한 실험군의 세포 생존율은 실험군의 평
균 OD₅₄₀ 값을 구하여 대조군의 평균 OD₅₄₀ 값에 대한 백분율
로 나타내었다.¹⁴⁾

DPPH로의 전자공여능 - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)
가 생약제의 전자공여에 의해 환원되는 정도를 Tomohiro등의 방

법¹⁵⁾을 변형하여 측정하였다. 16 mg DPPH/100 ml ethanol과
0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.6)의 1:1 혼합액 1.9 ml에
생약제 0.1 ml을 첨가하여 OD₅₁₇값을 측정하였다.

U937세포로부터의 arachidonic acid 유리 억제능 - 대수기의
U937에 1 µM 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)를
첨가하고 4일 배양하여 세포를 분화시킨 후 10 µg/ml 생약제를
포함한 배지로 교환하고 24시간 배양하였다. 이 세포에 1 µM
calcium ionophore A23187를 첨가하여 2시간 더 배양한 후 세
포를 회수하여 PBS로 세척하고 1% Triton X-100 in PBS(pH
7.4)로 파쇄하였다.¹⁶⁾ 세포 파쇄액에 chloroform : methanol(1:2,
v/v) 3 ml를 가한 후 4,000 rpm에서 30분 원심분리한 후 하층액
을 취하여 증류수 0.8 ml를 첨가하고 3,000 rpm에서 30분 원심
분리하였다.¹⁷⁾ 하층액을 취해서 vacuum dry oven(40°C)에서 건
조한 후 methylation 시킨 후 hexane 1 ml, 증류수 2 ml를 가하
고 상층액(fatty acid methyl ester)을 취하여 시료로 사용하였
다. Gas chromatograph(Shimatzu GC-17A, Japan)의 분석조건
은 BP21(Stabilwax-DB, 0.25 mm×30 m) column과 FID
detector를 사용하였고, injector온도는 250°C, detector온도는
250°C로 하였으며, column온도는 100°C(0 min)에서 200°C(40
min)까지 2.5°C/min로 증가시켰고, Carrier gas는 N₂ gas(200
kPa)를 사용하였다. Arachidonic acid peak의 확인은 Sigma사로
부터 구입한 표준물질을 이용하였다.¹⁸⁾

자료분석 및 통계처리 - 모든 실험 결과는 평균±표준편차로
표기하였고 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 P값이
0.05 미만일 때 유의하다고 판단하였다.

실험결과 및 고찰

세포독성 - 대부분의 약물은 고농도에서 세포 독성을 나타내
기 때문에 cell line을 이용한 실험에서는 첨가 약물이 세포 생육
에 영향을 주지 않는 범위 내에서만 실험이 가능하다. 따라서 생
약제 자체의 세포 독성 측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위
결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. U937 세포에 대한 생
약제의 세포 독성을 측정한 결과, IC₅₀값이 항암효과의 기준이
되는 수치인 230 µg/ml에 비하여¹⁹⁾ 매우 높은 수치로 3가지 수
추출물은 비교적 낮은 세포독성을 가짐을 알 수 있다(Table I).
송지에 대하여서 정제송지와 상지加송지는 세포 생존율의 유의

Table I - Cytotoxicity of Water extracts of Pini Resina

Water extracts	IC ₅₀ (µg/ml) ^{a)}
Pini Resina	594.72
Prerated Pini Resina	583.71
Ramus Mori Albae-added Pini Resina	699.31

^{a)}IC₅₀ value represents the concentration of a water extract required for 50% inhibition of cell growth

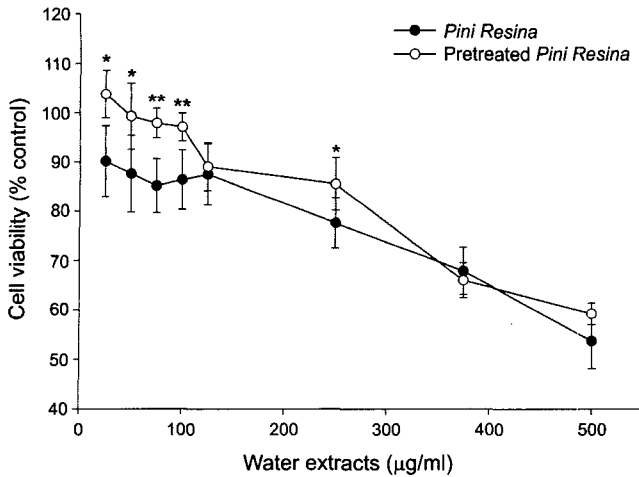


Fig. 1 – Relative cytotoxicity of Pini Resina and pretreated Pini Resina on U937 by MTT assay. Results indicate mean \pm S.D. of 5 experiments. *P<0.05 **P<0.01 (Student's t-test): significant to Pini Resina

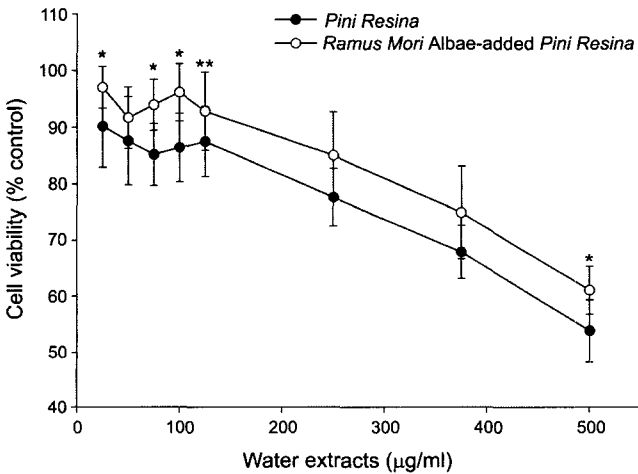


Fig. 2 – Relative cytotoxicity of Pini Resina and Ramus Mori Albae-added Pini Resina on U937 by MTT assay. Results indicate mean \pm S.D. of 5 experiments. *P<0.05 **P<0.01 (Student's t-test): significant to Pini Resina

적인 증가를 보였는데, 이것은 본초강목 중의 송지를 일단 물에 끓여내어 굳힌 것을 사용해야만 독성을 제거할 수 있다는 것과 내시시훈 중의 정제 방법의 하나로 송지에 상지를 첨가하여 정제한 것을 사용하였다는 것을 입증한다고 생각된다(Fig. 1, 2). 또한 이러한 결과를 바탕으로 cell line을 이용하는 실험에는 대략적으로 80% 이상의 생존율을 나타내는 125 µg/ml 이하의 농도를 사용하였다.

DPPH로의 전자공여 효과 – 염증 발생 조직 주위의 neutrophils, monocytes, macrophages 등은 활성 radical과 oxidant를 생산, 분비하여 세포와 조직을 손상시킨다. McCall등은 antioxidant vitamin들이 ROS로 인한 염증부위를 수복한다고 하였다.²⁰⁾ 따라서 염증부위의 손상을 억제하기 위한 3가지 수추출물의 전자공

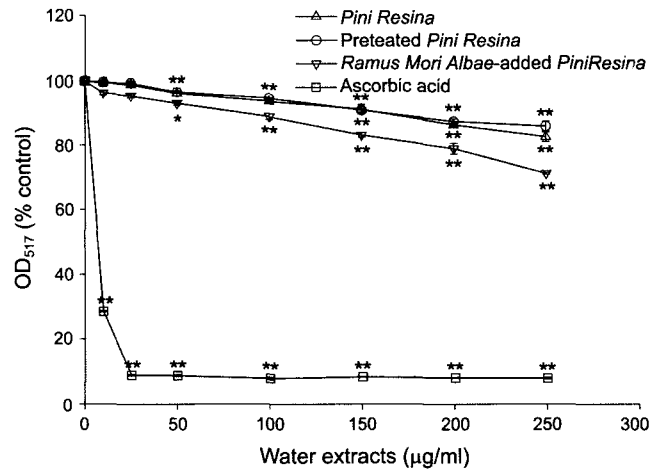


Fig. 3 – DPPH radical scavenging effect of Water extracts. Results indicate mean \pm S.D. of 3 experiments. *P<0.05 **P<0.01 (Student's t-test): significant to Pini Resina

Table II – DPPH radical scavenging effect of water extracts of Pini Resina

Water extracts	ED ₅₀ (µg/ml) ^{b)}
Pini Resina	724.43
Pretreated Pini Resina	834.05
Ramus Mori Albae-added Pini Resina	466.84

^{b)}ED₅₀ value represents the concentration of a water extract required for 50% decrease of DPPH radicals

여능을 알아보았다. 보라색의 free radical form인 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)은 전자를 공여받으면 환원되어 탈색된다.¹⁵⁾ 비교군인 ascorbic acid에 비해서는 효과가 떨어지는 것으로 나타났으나 수추출물의 농도가 높아질수록 DPPH가 더 환원되어 흡광도가 낮아지는 것으로 보아 정제송지, 송지, 상지+송지 모두 전자공여에 의한 항산화능이 있다고 생각된다(Fig. 3). 또한 ED₅₀값을 바탕으로 정제송지, 송지, 상지+송지의 순으로 전자공여능이 커짐을 알 수 있다(Table II)

U937세포로부터의 arachidonic acid 유리억제 효과 – 민간요법으로, 송지를 연필처럼 한 쪽 끝을 뾰족하게 만들어 치주질환이나 충치로 인한 진통의 목적으로 꽂아 쓴다고 하였다.²¹⁾ 따라서 3가지 수추출물이 염증의 매개체인 arachidonic acid의 유리를 어느 정도 억제하는지에 대해서 알아보았다. Rzigalinski등은 TPA로 분화된 U937을 calcium ionophore A23187로 처리하면 arachidonic acid를 유리한다고 보고하였다.²²⁾ TPA로 분화시킨 대조군에 대하여 송지는 75%, 정제송지는 76%, 상지+송지는 66%로 arachidonic acid의 유리를 유의적으로 억제시켰다(Fig. 4). 위의 결과를 바탕으로 3가지 수추출물은 염증의 매개체이자 진통물질의 전구체인 arachidonic acid의 유리를 억제시킴으로써 염증의 억제와 진통 효과가 있을 것으로 사료된다.

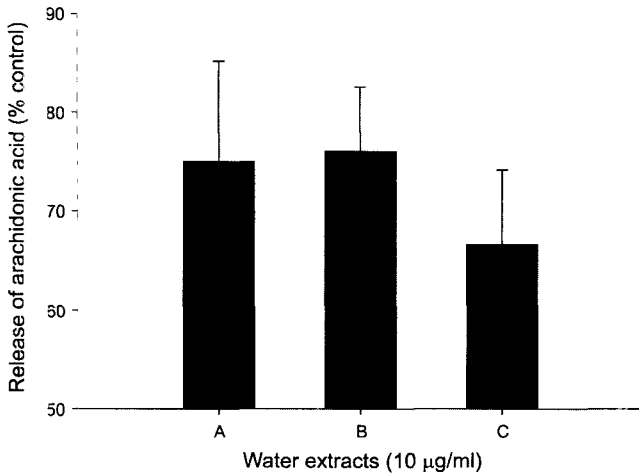


Fig. 4 - Effect of water extracts on release of arachidonic acid. Results indicate mean \pm S.D. of 3 experiments. *P<0.05 (Student's t-test): significant to control
 A. Pini Resina
 B. Pretreated Pini Resina
 C. Ramus Mori Albae-added Pini Resina

결론

송지가 치주질환에 미치는 영향을 알아보기 위하여 송지, 정제송지, 상지加송지의 세포독성과 항산화 및 arachidonic acid 생성 억제 작용을 알아본 결과를 종합해 볼 때, 송지 특히 상지加송지는 세포독성이 낮으며, 염증 증상에 효과를 보이므로 치주질환을 치료하는 구강세정제의 첨가물로서 잠재력이 있다고 생각된다.

문헌

- 1) Slot, J. : Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **18**, 351 (1979).
- 2) Newman, M. G. and Socransky, S. S. : Predominant cultivable micro biota in periodontosis. *J. Periodont. Res.* **12**, 120 (1977).
- 3) McGEE, J. O., Isaacson, P. G. : Oxford textbook of pathology Vol II. Oxford Medical Publications. 1091 (1988).
- 4) Assev, S., Scheie, A. and Rolla, G. : Potential of xylitol, mannitol and sorbose to inhibit metabolism in Streptococcus sorbrinus OMZ 176. *J. Dent. Res.* **68**, 1729 (1989).
- 5) McCord, J. M. : The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann. Interd. Med.* **89**, 122 (1978).
- 6) Lehinger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. : Principles of Biochemistry. 3rd ed. *Worth Publisher.* 784 (2000).
- 7) Namba, T. : The encyclopedia of Wakan-Yaku. Vol II, Hoikusa 191 (1980).
- 8) Huang, K. C. : The pharmacology of chinese herbs. CRC Press

- 95 (1993).
- 9) Miller, R. A., Melver, J. E. and Gunsolley, J. C. : Effects of sanguinaria extract on plaque retention and gingival health. *J. Clin. Orthod.* **12**, 304 (1988).
- 10) Sakanaka, S. M., Kim, M., Taniguchi, M. and Yamamoto T. : Antibacterial substances in Japanese green tea extract against Streptococcus mutans, a carcinogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2307 (1983).
- 11) 박원재 외 : 상백피의 sanggenon C에 의한 Streptococcus의 생육 및 균부착 저해 효과. *약학회지* **34**, 434 (1990).
- 12) Jeon, W. K., Park, K. J., Kim, S. Y., Ma, J. Y. and Sung, H. J. : In vitro studies on the anticancer effect and topoisomerase I inhibition activity of Caesalpinia sappan L. extract. *Kor. J. Pharmacogn* **30**(1), 1 (1999).
- 13) Freshney, R. I. : Animal cell culture : a practical approach, 2nd edition. IRL Press (1992).
- 14) Rubinstein, L. V., Shemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tošini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A. and Boyd, M. R. : Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data general with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1113 (1990).
- 15) Tomohiro, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. and Sakata, K. : A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by murine bacteria from fish and shellfish. *Biol. Biotech. Biochem.* **58** (1980).
- 16) Beverly A. Rzigalinski, Miriam D. Rosenthal : Effects of DMSO-induced differentiation on arachidonate mobilization in the human histiocytic lymphoma cell line U937 : responsiveness to sub-micromolar calcium ionophore A23187 and phorbol esters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1223**, 219 (1994).
- 17) Shibamoto, T. : Lipid chromatographic analysis. *Chromatographic Science Series*, 65 (1994).
- 18) Baugh, P. J. : Gas chromatography : a practical approach. *IRL Press* **71**, 146 (1993).
- 19) Park, J. G., Hyun, J. W., Lim, K. H., Shin, J. E., Won, Y. J., Yi, Y. D., Shin, K. H., Chang, I. M. and Woo, W. S. : Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**(3), 223 (1993).
- 20) Mark R. McCall and Balz Frei : Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad. Biol. Med.* **26**(7/8), 1034 (1999).
- 21) 윤상욱 : 소나무와 자연요법. 아카데미서적. 67 (1997).
- 22) Beverly A. Rzigalinski, Miriam D. Rosenthal : Effects of DMSO-induced differentiation on arachidonate mobilization in the human histiocytic lymphoma cell line U937 : responsiveness to sub-micromolar calcium ionophore A23187 and phorbol esters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1223**, 219 (1994).