

택사 열수 및 에탄올 추출물의 항산화활성과 human LDL 산화억제 및 ACE 저해효과에 미치는 영향

양영이, 이민자, 정현정, 이혜숙, 김 혁, 나선택, 박선동*, 박원환
동국대학교 한의과대학 MRC · 진단학 교실, *동국대학교 한의과대학 방제학 교실

Screening of Antioxidative, Anti-atherosclerotic Effect of *Alisma Rhizome* Extracts

Young-yi Yang, Min-ja Lee, Hyun-jung Jung, Hye-sook Lee,
Hyuck Kim, Sun-taek Na, Sun-dong Park*, Won-hwan Park
Cardiovascular Medical Research Center and Dept. of Diagnostics,
*Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The study was conducted to evaluate antioxidative, anti-atherosclerotic and anti-hypertensive effects of natural remedies. *Alisma Rhizome* (AR) has been used for a long time in Asia in folk remedies for treatment of hypertension and stroke and has been used in Korean traditional medicine for the treatment of glycosuria, gonorrhoea, hypercholesterolemia, hypertension, and jaundice and its diuretic effect. These pharmacological effects of AR might come from antioxidant properties of phytochemicals in these materials.

Methods : In this study, the antioxidant activity of extract from AR was studied with *in vitro* methods by measuring the antioxidant activity by TEAC, measuring the scavenging effects on reactive oxygen species (ROS) [superoxide anion, hydroxyl radical] and on reactive nitrogen species (RNS) [nitric oxide and peroxyxynitrite] as well as measuring the inhibitory effect on Cu²⁺ induced human LDL oxidation and on ACE.

Results : The AR extracts were found to have a potent scavenging activity, as well as an inhibitory effect on LDL oxidation and on ACE against all of the reactive species tested, with the water extract showing particularly strong antioxidant activities.

Conclusions : The AR extracts have antioxidative, anti-atherosclerotic and anti-hypertensive effects in an *in vitro* system, which can be used for developing pharmaceutical drugs against oxidative stress and atherosclerosis.

Key words : *Alisma Rhizome* (AR), antioxidative, anti-atherosclerotic, anti-hypertensive

1. 서 론

- 교신저자: 박원환 경북 경주시 석장동 707번지
동국대학교 한의과대학 MRC · 진단학 교실
TEL: 054-770-2373 FAX: 054-770-2376
E-mail: diapwh@dongguk.ac.kr
- 본 연구는 과학 기술부/ 한국과학재단 기초과학 연구센터
육성 사업 (grant #: R13-2005-01001-0) 및 동국대학교 학술
지원 사업비의 지원으로 수행되었습니다.

생체는 정상적인 생리 상태에서 유리기(free radical)가 생성되며 이러한 유리기를 제거하는 항산화 방어계(antioxidant defense system) 사이가 균형을 이루고 있다. 그러나 여러 가지 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 유리기의 과다 생성을 촉진하거나 항산화계의 활성을 감소시켜 세포에 상해를 주며, 혈관을 비롯한 여러 조직의 손상을 일으키므로 여러 가지 만성퇴행성 질환의 원인으로 지적되고 있

다¹. Superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등과 같은 유리기를 제거시켜 생체를 보호하는 항산화 효소로는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Re) 등이 있고 비효소적 항산화제로 천연항산화제인 α -tocopherol, β -carotene, ascorbic acid (AA), glutathione 및 합성 항산화제인 probucol이나 N,N'-dephenylenediamine, t-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA), 3,5-(t-Butyl)-4-hydroxytoluene (BHT) 등이 있으며, 이러한 항산화 방어계는 조직을 산화적 스트레스로부터 보호한다². 그러나 노화가 됨에 따라 항산화효소계의 활성산소에 대한 방어능력이 감소되고, 합성 항산화제는 변이원성 및 독성을 유발하므로 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구된다³.

동맥경화의 산화적 스트레스 및 염증과의 연관성은 죽상동맥경화의 진행 과정에서 나타난다. 죽상동맥경화의 발병은 산화 LDL (Low density lipoprotein: 저밀도 지질 단백질)이 혈액 중의 단핵구를 혈관 내막 안으로 유입시키면서 시작된다. 유입된 단핵구는 대식세포로 분화되어 산화 LDL을 탐식하고 활성화된 대식세포가 되어 거품세포를 형성하고 혈관 평활근세포에 축적되어 죽상동맥경화를 일으키게 된다⁴. 그러므로 동맥경화는 산화적 스트레스에 의해 활성화된 대식세포가 중요한 역할을 담당하는 만성적 염증 질환이라 할 수 있다.

한편, 산화적 스트레스와 관련된 동맥경화에 의해 유발되는 고혈압에 있어서 혈관의 수축 및 이완은 주로 레닌-안지오텐신 시스템 (renin-angiotensin system (RAS))에 의한 생리학적 기전으로 설명되고 있는데, RAS를 조절하는 단계 중 가장 중요한 효소는 안지오텐신 전환 효소 (angiotensin converting enzyme (ACE))로서 안지오텐신 I (Ang I)을 생리활성이 있는 안지오텐신 II (Ang II)로 전환시킨다⁵. Ang II는 Ang II-1형 (type 1 (AT1)) 수용체와 결합하여 혈관수축과 알도스테론의 분비를 증가시키는 물질이며⁶, superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, peroxynitrite과 같은 활

성 산소종 (Reactive Oxygen Species: ROS) 및 활성 질소종 (Reactive Nitrogen Species: RNS)의 생성을 증가시켜 내피세포의 기능 이상 및 LDL 산화를 촉진하여 혈관의 염증반응을 유도한다⁷. 이러한 RAS 기전 및 ROS 관련 기전에 항산화제가 작용하게 되면 Ang II와 AT1-수용체의 작용을 방해하며 항산화효소계의 활성을 증가시킴으로써 세포 손상을 감소시키고 NO (Nitric Oxide: 산화질소) 생성을 증가시켜 혈관확장을 통해 심근 경색 유도 동맥경화의 위험을 감소시키게 된다⁸.

택사(澤瀉, *Alisma Rhizoma*, AR)는 학명이 *Alisma canaliculatum*로서, 택사과에 속한 다년생 沼澤植物인 질경이 택사 *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* 혹은 택사 *A. canaliculatum*의塊莖을 건조한 것으로, 겨울에 입이 마른 다음 채취하여鬚根과粗皮를 제거하고 건조한다. 괴경에는 많은 종류의 triterpenoid 화합물을 함유하며, alisol A·B·C 및 alisol A monoacetate, alisol B monoacetate, alisol C monoacetate, epi-alisol A, 24-acetyl A, 23-acetyl-alisol B, 23-acetyl C 등은 포괄하고, 아울러 수지, 단백질, 다량의 전분을 함유한다⁹. 택사에 관한 연구로는 메탄올 추출물의 항산화작용¹⁰, 부탄올 분획물과 셀레늄, 비타민 E 보충이 streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐의 글리코겐 함량, 지질대사 및 지질과산화에 미치는 영향^{11,12}, 항균 및 항진균작용¹³ 등이 보고되었다.

따라서, 본 연구에서는 택사의 항산화효과, LDL 산화억제효과 및 ACE 저해효과를 *in vitro*에서 천연 항산화제로 가장 많이 알려진 AA와 합성 항산화제인 BHT와 비교하여 관찰하고 동맥경화 및 고혈압 예방·치료제로서의 개발 가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic

acid (Trolox), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), butylated hydroxytoluene (BHT), dimethyl sulfoxide (DMSO), L-ascorbic acid, α -tocopherol, deoxyribose, hydrogen peroxide (H_2O_2), nitrobluetetrazolium (NBT), trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), hypoxanthine, xanthine oxidase, DL-penicillamine, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), 3-morpholinopyridone hydrochloride (SIN-1), copper (II) sulfate ($CuSO_4$), ascorbic acid (AA), human low-density lipoprotein (LDL), sodium nitroprusside와 gallic acid는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Dihydrorhodamine 123 (DHR123)와 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였고, peroxy nitrite는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)로부터 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, ferric chloride ($FeCl_3$), ferrous chloride ($FeCl_2$)와 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였고 그 외 기타 시약들은 제1급 정품을 사용하였다.

2) 시료 및 시료의 제조

본 실험의 시료로 사용한 텍사 (澤瀉, *Alisma Rhizome*, AR)는 학명이 *Alisma canaliculatum*로서 생약인 AR은 2006년산 국산제품을 (주) 옴니허브에서 구입한 후 정선수치하여 사용하였다.

(1) 텍사 열수 추출물 (ARW)의 제조

시료 100 g을 마쇄한 후 3 L round flask에 넣고 2 L의 물을 가한 다음 가열 맨틀에서 3시간 전탕하였다. 이를 1 mm-pore-size filter (Whatman No. 2)로 여과한 후 불용성 물질들은 제거하였다. 여과된 약액은 rotary vacuum evaporator (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland)를 이용하여 감압농축한 후 동결건조하여 11.58 g의 동결건조분말 시료를 얻었다(수율: 11.58%).

(2) 텍사 70% 에탄올 추출물 (ARE)의 제조

시료 100 g에 2 L의 70% 에탄올을 첨가하여 1차 12시간, 2차 6시간, 3차 3시간 동안 실온에서 교반 추출한 뒤 1 mm-pore-size filter (Whatman No. 2)를 통해 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland)로 감압농축한 뒤 동결건조하여 동결건조분말 시료 13.0 g을 얻었다(수율: 13%).

2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) assay에 의한 항산화 효과의 측정

10 μ L의 AR 추출물 희석용액 (1 mg/mL) 또는 Trolox standard에 ABTS^{•+} 용액 1.0 mL를 첨가하여 1분 후 UV/Visible spectrophotometer (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 6분간 monitoring하였고 1 mM Trolox와 비교하여 흡광도의 저해율을 구한 뒤 이를 다시 Trolox standard curve에 대입하여 TEAC 값으로 나타내었다.

3. DPPH에 의한 유리기 소거 효과의 측정

DPPH (α, α' -diphenyl- β -picryl-hydrazyl) 16 mg을 100 mL의 에탄올에 녹인 후 100 mL의 증류수를 혼합하여 여과지로 여과한 후 이 여액 2.5 mL에 일정농도의 텍사 추출물 0.5 mL을 혼합한 후 528nm에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 IC_{50} 값으로 나타내었다.

4. Superoxide anion 소거 효과의 측정

시험관에 일정 농도의 텍사 추출물, 30 mM의 EDTA (pH 7.4), 50 mM의 NaOH에 녹인 30 mM hypoxanthine 및 1.42 mM nitro blue tetrazolium (NBT)을 각각 30 μ L, 100 μ L, 10 μ L, 200 μ L 첨가하여 강하게 교반하였다. 상온에서 3분간 반응시킨 혼합물에 0.5 U/mL xanthine oxidase 100 μ L를 첨가한 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용

하여 최종 부피를 3 mL로 조정하였다. 이를 다시 상온에서 20분간 반응시킨 후 560 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

5. DCFDA assay에 의한 hydroxyl radical 소거 효과의 측정

텍사 추출물의 ·OH의 제거능을 측정하기 위하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) 측정방법을 사용하여 측정하였다. 시료 10 µL, menadione 10 µL, potassium phosphate buffer (pH 7.4) 130 µL를 넣어 ·OH를 생성시킨 후, 125 µM DCFDA에 esterase를 넣어 바꾼 DCFDH를 50 µL 첨가하여 60분간 생성된 형광의 변화를 측정하였다. 이 형광의 양을 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 fluorescence microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하여 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

6. NO radical 소거 효과의 측정

텍사 추출물의 NO radical 소거 효과는 DAF-2 assay를 이용하여 측정하였다. 1 mg의 DAF-2를 550 µL의 DMSO에 용해시킨 후 이를 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1 : 400배로 희석하였다. 96 well plate에 일정농도의 텍사 추출물과 NO 제공물질인 SIN-1과 DAF-2를 에 첨가하였으며, DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10 분 후 excitation wave length 485 nm 및 emission wave length 530 nm에서 fluorescence microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하여 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

7. Peroxynitrite 소거 효과의 측정

96-well microplate에 텍사 추출물을 농도별로 취하고 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 µM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 µM DHR

123를 함유하는 sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하였다. 이에 10 µM ONOO⁻를 첨가한 후 fluorescence microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 excitation 500 nm, emission 536 nm에서 형광강도를 측정하여 IC₅₀ 값으로 나타내었다. ONOO⁻ 생성원으로는 시판되는 peroxyxynitrite 를 직접 사용하거나 SIN-1에 의해 생성되는 superoxide anion과 nitric oxide의 반응으로 발생하는 ONOO⁻의 제거 활성능을 검토하였다.

8. Relative Electrophoretic Mobility (REM) Assay의 측정

Human LDL의 REM 측정을 위해 PBS (pH 7.4)에 녹인 LDL (120 µg/mL)를 일정 농도의 텍사 추출물, 10 µM CuSO₄와 혼합하여 37°C에서 12 시간동안 배양 한 후, 3 µg의 LDL을 0.7% agarose gel에 loading하여 TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, and 1mM EDTA)에서 85 V로 1시간 동안 전기 영동하였다. Gel은 건조하여 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하였고, 샘플의 inhibition ratio (%)는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{migration distance of ox LDL} - \text{migration distance of s LDL}}{\text{migration distance of ox LDL} - \text{migration distance of n LDL}} \times 100$$

ox LDL: oxidized LDL, s LDL: sample LDL, n LDL: native LDL

9. Human LDL 산화 억제효과 측정

텍사 추출물의 human LDL 산화 억제효과 측정을 위해 human LDL 0.5 mL (120 µg/mL)에 10 mM PBS buffer (pH 7.4)를 1.5 mL, 0.1 mM CuSO₄ 40 µL 및 용매 또는 시료 40 µL를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 여기에 20% TCA를 1.5 mL, 0.05 M NaOH에 녹인 0.67% TBA를 1.5 mL 첨가하였다. 반응 혼합액을 90°C, 45분간 water bath에서 배양하고 차갑게 냉각한 후 2,000×에

서 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 기포를 제거한 후 532 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 저해율을 구한 후 IC₅₀ 값으로 환산하였다.

10. ACE 저해효과의 측정

텍사 추출물의 ACE 저해효과 측정을 위해 기질 (Hippuryl-His-Leu)과 효소를 ACE buffer (0.1 M sodium borate buffer containing 300 mM NaCl, pH 8.3)에 각각 최종 농도가 25 mM, 40 mU가 되도록 녹인 후 모든 시험관에 200 µL의 buffer와 100 µL의 기질을 첨가하였다. 대조군을 제외한 시험관에 100 µL의 텍사 추출물을 넣고 대조군 시험관에는 100 µL의 buffer를 넣어 vortex한 후 37°C로 배양시켰다. Blank 시험관을 제외하고 모든 시험관에 일정간격을 두고 효소를 100 µL씩 첨가하고 vortex한 후 37°C로 30분간 배양하고 반응 정지를 위해 1.0 N HCl을 500 µL 첨가하였다. 이때 blank 시험관은 마지막으로 HCl을 넣고 바로 효소 100 µL를 첨가하였다. 모든 시료에 3 mL의 ethyl acetate를 첨가하여 vortex한 후 hippuryl acid 추출을 위해 10분간 방치하고 새로운 시험관에 상층의 ethyl acetate를 2.5 mL씩 넣었다. 이 ethyl acetate층을 100°C Dry oven에서 4시간 동안 건조시키고 건조된 시료에 각각 3 mL의 물을 첨가한 후 228 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

효소 활성 저해율의 계산은 다음과 같이 행하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{(A \text{ control}-A \text{ blank}) - (A \text{ sample}-A \text{ blank})}{(A \text{ control}-A \text{ blank})} \times 100$$

11. 통계처리

통계 분석은 SPSS (version 14.0 for Windows, SPSS Inc.) program을 이용하여 각 군의 평균과 표준편차를 산출하고 군 간의 차이 유무를 one-way ANOVA로 분석한 뒤 p<0.05에서 유의한 차이가

있는 경우 Tukey test를 이용하여 검정하였다.

III. 결 과

1. TEAC assay에 의한 항산화 효과

텍사를 열수 및 70% 에탄올로 추출하여 이들의 항산화 효과를 TEAC법으로 측정한 결과는 Table 1 과 같다. 70% 에탄올 추출물 (0.011)에 비해 열수 추출물 (0.024)에서 항산화효과가 약 2.2배 높게 나타났다(Table 1).

Table 1. Antioxidant Activities of the Extracts of AR as Determined by the ABTS⁺ Assay

	AR Extracts (1 mg/mL)		Positive control (1 mg/mL)
	W ^a	E	Trolox
TEAC (mM Trolox equivalent)	0.024 ±0.001 ^b	0.011 ±0.002	1

^aW, water extract; E, 70% ethanol extract.

^bEach value represents the mean ± SE of triplicate measurements.

2. DPPH에 의한 유리기 소거 효과

DPPH를 이용하여 텍사의 열수 및 70% 에탄올 추출물들의 유리기 소거효과를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 열수 및 70% 에탄올 추출물의 유리기 소거효과는 IC₅₀ 값이 각각 1,937.01 µg/mL 및 1,975.04 µg/mL으로 나타났으나, 대조군으로 사용된 천연 항산화제인 AA (IC₅₀=162.80 µg/mL) 및 합성 항산화제인 BHT (IC₅₀=191.15 µg/mL)보다는 현저히 낮았다(Table 2).

3. ROS (superoxide anion 및 hydroxyl radical) 소거 효과

텍사 열수 및 70% 에탄올 추출물의 superoxide anion 활성을 측정한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 IC₅₀ 값이 각각 29.09, 50.77 mg/mL로 AA

(IC₅₀=1.22 mg/mL) 보다는 낮게 나타났으나 BHT (NA) 보다는 높았다(Table 2). Hydroxyl radical 소거 효과를 측정한 결과 IC₅₀ 값이 각각 2,205.27, 3,328.35 µg/mL로 나타나 강력한 항산화제로 알려져 있는 AA (IC₅₀=59.79 µg/mL) 보다는 낮았으나 BHT (NA) 보다는 높았다(Table 2).

4. RNS (NO radical 및 peroxynitrite) 소거 효과
 텍사 추출물의 발암성 nitrosamine의 직접적인 생성 인자인 nitric oxide 소거 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 열수 추출물 (IC₅₀=5.17 µg/mL) 및 70% 에탄올 추출물 (IC₅₀=9.54 µg/mL)

에서 비교적 높은 NO radical 소거 활성을 나타낸 반면, 대조군으로 이용된 AA (IC₅₀=59.79 µg/mL) 및 BHT(NA)는 텍사에 비해 현저히 낮은 소거 효과를 보였다(Table 2). 또 다른 RNS 중 하나인 peroxynitrite 소거 효과를 측정한 결과, 70% 에탄올 추출물 (IC₅₀=1.24 µg/mL)의 peroxynitrite 소거 효과가 열수 추출물 (IC₅₀=2.65 µg/mL)의 소거 효과에 비해 더 높은 것으로 나타났으며 열수 추출물의 경우 대조군으로 사용된 AA (IC₅₀=2.54 µg/mL) 보다 높은 소거 효과를 보여, 텍사가 효과적인 peroxynitrite 소거제로 작용함을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. DPPH Radical, ROS (Superoxide anion, Hydroxyl radical) and RNS (Nitric Oxide Radical, Peroxynitrite) Scavenging Activities of Extracts from AR

	AR Extracts		Positive control	
	W ^a	E	AA	BHT
DPPH radical scavenging activities (IC ₅₀ = µg/mL)	1,937.01±23.34 ^b	1,975.04±25.87	162.80±9.64	191.15±10.12
Superoxide anion scavenging activities (IC ₅₀ = mg/mL)	29.09±2.45 ^b	50.77±4.12	1.22±0.02	NA ^c
Hydroxyl radical scavenging activities (IC ₅₀ = µg/mL)	2,205.27±25.69 ^b	3,328.35±45.04	59.79±2.96	NA ^c
Nitric oxide radical scavenging activities (IC ₅₀ = µg/mL)	5.17±0.35 ^b	9.54±0.83	59.79±2.96	NA ^c
Peroxynitrite scavenging activities (IC ₅₀ = µg/mL)	1.24±0.26 ^b	2.65±0.51	2.54±0.04	572.41±28.90

^aW, water extract; E, 70% ethanol extract; AA, ascorbic acid.

^bEach value represents the IC₅₀, mean ± SE of triplicate measurements.

^cNA is not active.

5. Relative Electrophoretic Mobility (REM) Assay
 Fig. 1은 Cu²⁺에 의해 유도되는 LDL 과산화의 REM에 대한 텍사의 효과를 보여주고 있다. Native LDL의 REM을 1이라고 가정했을 때, Cu²⁺ 첨가

에 의해 REM이 3.57까지 증가하였고, 텍사 열수 추출물 1 µg/mL 첨가에 의해 1.42까지 감소되었다 (Fig. 1).

텍사 열수 및 에탄올 추출물의 항산화활성과 human LDL 산화억제 및 ACE 저해효과에 미치는 영향

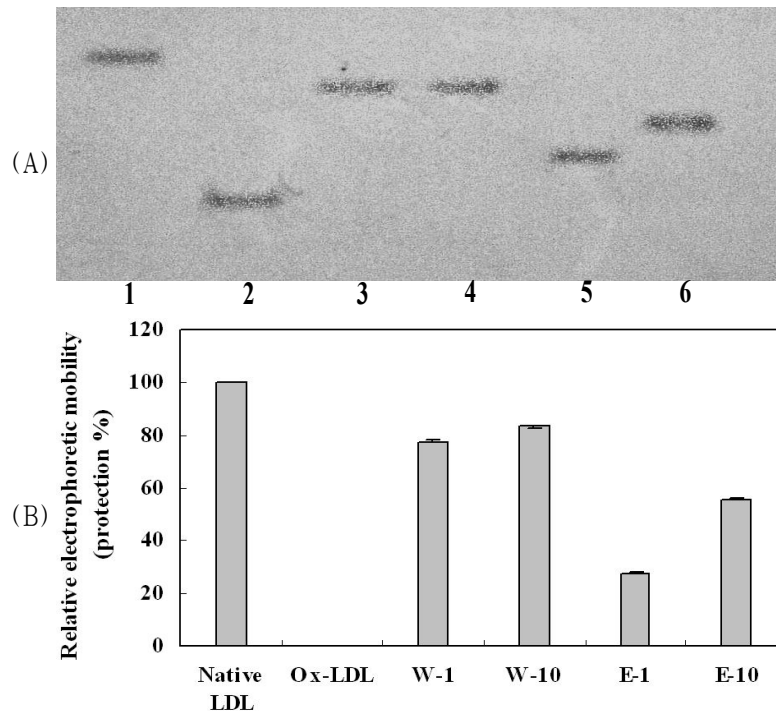


Fig. 1. The Relative Electrophoretic Mobility (REM) of Human LDL Incubated with Cu^{2+} and with or without Extracts of AR.

LDL (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was oxidized with 10 μM CuSO_4 at 37 $^\circ\text{C}$ in the presence of AR extracts for 12 h. (A) Lane 1: native LDL; Lane 2: LDL and Cu^{2+} Lane 3,4: LDL and Cu^{2+} and 1, 10 μg of W; Lanes 5,6: LDL and Cu^{2+} and 1, 10 μg of E (B) Protection rate (%). Each value represents the mean \pm SE of triplicate measurements.

6. Human LDL 산화 억제효과

CuSO_4 유도-LDL 산화 억제효과에 대한 텍사 추출물의 효과를 검토한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 텍사 열수 및 70% 에탄올 추출물은 IC_{50} 값이 각각 98.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 121.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군으로 사용된 AA (IC_{50} =21.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 BHT (IC_{50} =26.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다는 낮았으나, 비교적 높은 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Inhibitory Effect on Cu^{2+} -induced LDL Oxidation of the Extract of AR.

	AR Extracts		Positive control	
	Wa	E	AA	BHT
Inhibitory effect on Cu^{2+} -induced LDL oxidation ($\text{IC}_{50} = \mu\text{g}/\text{mL}$)	98.34 \pm 8.63 ^b	121.62 \pm 9.85	21.09 \pm 0.62	26.31 \pm 0.22

^aW, water extract; E, 70% ethanol extract; AA, ascorbic acid.

^bEach value represents the IC_{50} , mean \pm SE of triplicate measurements.

7. ACE 저해효과

본 연구에서 텍사 열수 및 에탄올 추출물의

ACE 저해활성을 분석한 결과는 Table 4과 같다. 70% 에탄올 추출물 보다는 열수 추출물에서 ACE 저해활성이 높게 나타났고 특히, 텍사 열수 추출물 (100 µg/mL)에서 68.34%의 우수한 저해효과를 보여 대조군으로 사용된 ACE 저해제로 시판되고 있는 에날라프릴의 87.47%보다는 낮았지만 우수한 ACE 저해효과를 나타냄을 알 수 있었다(Table 4).

Table 4. Inhibitory Effect on ACE of the Extract of AR

	AR Extracts (100 µg/mL)		Positive control (100 µg/mL) Enalapril
	W	E	
Inhibitory effects on ACE (% inhibition)	68.34 ±2.52 ^b	51.75 ±1.28	87.47±0.39

^aW, water extract; E, 70% ethanol extract.

^bEach value represents mean ± SE of triplicate measurements.

IV. 고찰

항산화제는 세포막에서 다가 불포화 지방산을 공격하여 지질 과산화를 일으키는 ROS나 RNS를 소거하는데 이들이 생체 내에서 정상적으로 소거되지 않았을 때 산화적 스트레스가 여러 조직에서 세포막의 변화, 효소활성의 감소, DNA 손상과 돌연변이 생성에 영향을 주게 되며 암, 아테롬성경화증, 염증반응, 관절염, 알츠하이머병, 백내장, 당뇨병, 천식, 허혈 등의 만성 퇴행성 질환을 유발하게 된다¹. 이러한 산화적 손상(oxidative damage)은 효소적 항산화제 및 비효소적 항산화제를 포함하는 내인성 항산화 방어계에 의해 억제되어질 수 있다². 항산화 방어계는 ROS와 RNS를 감소시킬 뿐만 아니라 세포 내 redox state를 조절하고 redox signal transduction을 가능하게 하지만, 이러한 방어계는 완벽하지는 않다¹⁴. 항산화제는 LDL의 산화적 변형을 억제하므로 항산화 영양소가 Ox-LDL

의 형성을 저해한다면 동맥경화를 비롯한 심혈관계질환의 예방 및 치료에 유용할 것이다. 또한, 최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연물의 약리 기능성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 허브를 포함한 다양한 유용식물을 이용하여 전 세계적으로 식물자원에서 항암, 항알러지, 항비만, 항산화 및 항균 등에 효과가 있는 기능성 물질을 다량 함유하는 자원을 선별하여 이들 유용한 물질들을 약으로, 식품첨가제로 또는 화장품의 원료로 개발하려는 연구가 다양한 각도에서 진행되고 있다¹⁵.

TEAC법은 Miller 등¹⁶이 1993년에 개발한 방법으로서 항산화 효과 측정에 현재 가장 광범위하게 사용되는 방법으로 2,2-azinobis(3-ethylbenzo-thiazoline 6-sulfonate)의 양이온 라디칼(ABTS⁺)을 소거하는 항산화제의 능력을 평가하는 것에 기초하고 있다. 이 방법은 최대 734 nm 파장에서 측정함으로써 식물에서 나타날 수 있는 색간섭을 최소화 할 수 있으며 ABTS⁺가 물과 유기용매 둘 다에 용해되므로 친수성/소수성 시료 모두에 적용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 재연성이 뛰어나고 다양한 항산화제에 대해 유의적인 차이를 나타낼 만큼 민감도가 높은 것으로 알려져 있다. Rivero 등¹⁷은 14종의 와인에 대한 TEAC 값을 측정된 결과 와인의 종류에 따라 0.064~0.346으로 나타나 샘플에 따라 항산화능이 상당한 차이를 보이는 것으로 보고하였고 본 실험에서 텍사도 추출 용매에 따라 항산화능이 달라지는 경향을 보였다.

유리기는 산화에 의해 형성된 화학적 물질로서 항산화제는 이러한 유리기를 소거하는 능력을 가지고 있다. DPPH는 513 nm에서 흡광도를 보이는 보라색의 화합물로 항산화 활성의 측정에 사용된다¹⁸. Yen 등¹⁹은 BHA 농도 증가에 따른 유리기 소거 활성을 측정된 결과 200~1600 µg/mL까지 농도가 증가함에 따라 88.4~93.6%를 억제한 것으로 보고한 바 있다.

Superoxide anion은 hydrogen peroxide의 전구물

질이며, 특히 Fenton계 반응을 통하면 보다 강한 활성을 지닌 hydroxyl radical의 생성을 유발시킨다. 최근 혈관세포를 이용한 연구들에서 superoxide anion은 주로 생체 내에서 NAD(P)H oxidase와 xanthine oxidase의 반응에 의해 생성되며, 이는 동맥경화의 초기단계에서 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다²⁰. 본 실험에서는 텍사 열수 및 70% 에탄올 추출물의 superoxide anion 소거 효과를 측정하기 위해 NBT 환원법을 이용하였는데 이는 xanthine oxidase를 hypoxanthine과 반응시켜서 superoxide anion을 생성시키며, 생성된 superoxide anion은 hypoxanthine을 uric acid로, NBT를 환원형 diformazan으로 변환시킨다²¹. 또한 hydroxyl radical은 가장 반응성 있는 유리기로 근접한 biomolecule에 치명적인 손상을 입힌다. 따라서, 천연물에 존재하는 hydroxyl radical 소거제를 검색하는 것은 여러 다양한 질환을 예방하는 차원에서 중요한 의미가 있다. Hydroxyl radical 소거효과를 측정하기 위한 DCFDA assay는 Dye의 산화로부터 생성되는 형광을 측정함으로써 microsome과 ester DCFDA와의 상호반응성을 측정하는 방법으로 microsome의 산소 라디칼 생성을 자극하는 ferritin의 활성을 평가하기 위한 빠르고, 보다 더 민감한 시스템이다²². Superoxide anion과 Hydroxyl radical은 대표적 ROS로 본 실험에서 텍사의 열수 및 70% 에탄올 추출물에서 ROS 소거능이 AA 보다는 효과가 미미하지만, BHT보다는 탁월한 효과를 나타내었다.

질소산화물은 또 다른 종류의 활성종으로서 세포독성이 강하나 세포간 혹은 세포내 신호전달에 중요한 역할을 하며 생체 내에서 내피 의존성 확장 인자 (Endothelium Derived Relaxing Factor: EDRF)로서 면역반응에 관계하고 세포 항상성을 유지하는데 특히 기억력과 관련 있는 퇴행성 신경 전달물질로서의 가능성 때문에 현재 뜨거운 관심을 받고 있다. 질소산화물은 여러 조직에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터

합성되는데 NOS는 세 가지의 isoform을 가지고 있으며 type I (neuronal nitric oxide synthase, nNOS), type II (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 및 type III (endothelium nitric oxide, ecNOS)로 구분된다. 특히 대식세포가 활성화되면서 생성되는 NO는 주위 조직에 세포독성을 나타내는 것으로 유명하다. NO는 반감기는 6-10초로 대단히 짧아 실질적으로 직접 검출하여 연구하는데 어려움이 많으므로 대부분의 NO 연구는 NOS 발현 유무나 NO의 안정화된 부산물인 nitrite, nitrate를 측정하여 간접적으로 이루어지고 있다²³. 생체 내 혈관내피세포에서는 superoxide anion과 nitric oxide가 생성될 수 있으며 이들의 상호반응에 의하여 혈관세포벽 내에서 peroxynitrite가 생성되는데 이러한 일련의 반응과정에서 LDL의 산화적 변형과 혈관내피세포의 산화적 손상이 야기될 수 있다고 알려져 있다²⁴. Peroxynitrite는 그 반응성이 superoxide anion과 hydrogen peroxide 보다 강력하지만 생체 내 방어 기구는 아직 알려진 바가 없다. 본 실험은 nitric oxide와 peroxynitrite 소거능 실험으로 텍사 추출물이 RNS의 생성을 효과적으로 방지 할 수 있는지를 살펴본 결과 텍사의 열수 및 70% 에탄올 추출물에서 BHT에 비해 탁월한 효과를 나타냈으며, AA와 비교해서도 좋은 효과를 나타내었다.

혈액 중의 LDL은 cholesteryl ester의 운반체로서 그 조성은 3-5%의 triacyl glyceride, 40-44%의 cholesteryl ester, 20-24%의 phospholipid, 9-10%의 cholesterol 및 20-26%의 apolipoprotein으로 구성되어 있다. 최근에 와서 거품 세포의 생성원인으로 지방반 중 산화 LDL이 지목되고 있는데, LDL이 금속이온, macrophage 등에 의해 산화되면 cholesteryl ester가 증가하여 높은 세포 독성이 있는 유해산소, 유리기 및 과산화물이 생성됨으로써 이들이 세포 조직에 확산되어 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 산화된 LDL은 생리활성 물질을 분해하고 내피세포에 염증을 일으켜 혈전 및 칼슘 침착으로 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다²⁵. Ryu²⁶는 플

라보노이드에 의한 LDL 산화 억제효과를 측정할 결과 농도 의존적으로 malondialdehyde (MDA)의 생성을 억제하여 생체 내에서 산화적 스트레스에 의해 유발되는 손상과 그로 인한 질병유발을 예방하는데 좋은 소재가 될 수 있음을 시사한 바 있다. REM assay와 human LDL 산화 억제 효과를 살펴본 결과 텍사의 강력한 항산화활성이 산화 LDL 내의 지질 과산화물의 축적에 의해 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 세포의존성 동맥경화의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용될 수 있음을 시사한다.

한편, ROS 및 RNS는 동맥경화와 관련된 고혈압을 유발하는 RAS 기전에도 관여하는데 RAS는 주로 신장에 분포하여 신기능을 조절하는 등 혈관의 수축 및 이완에 있어서 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 최근에는 심장, 간, 허파 등 다양한 조직에도 분포하는 것으로 알려져 그 중요성이 대두되고 있다⁵. RAS를 조절하는 단계 중 가장 중요한 효소인 ACE는 Ang I을 생리활성이 있는 Ang II로 전환 시킨다⁶. Ang II는 NADH/NADPH 산화효소의 작용을 통해 내피세포 내 산화적 스트레스를 야기하며 이 효소의 자극은 혈관 superoxide anion의 생성을 유도하여 혈관평활근 세포의 비대 및 사멸과 같은 내피세포의 기능 이상을 초래함으로써 NO의 생체 이용률을 감소시킨다. 또한, ACE는 칼리크레인/키닌 계(kallikrein/kinin system)에도 작용하여 혈관 이완물질인 브라디키닌(bradykinin)의 C-말단을 분해하여 혈관이완을 억제시킨다^{6,7}. ACE 저해제는 Ang II의 생성과 브라디키닌의 분해를 억제시켜 혈관의 수축과 이완을 조절할 목적으로 개발되었다. 현재는 에날라프릴, 캡토프릴, 조페노프릴, 리시노프릴 및 테르노카프릴 등이 개발되어 상업적으로 이용되고 있으며 고혈압, 울혈성 심부전, 심근경색, 당뇨병 신염 및 신부전 등의 치료제로 널리 사용되고 있다²⁷. 그러나 이러한 약제들은 미각이상, 백혈구 감소, 혈관부종, 간기능 이상 및 머리카락 등의 부작용이 많아 천연물질로부

터 ACE 저해제를 개발하기 위해 많은 연구들이 활발하게 진행되고 있다. Kwon 등²⁸은 국내에 자생하는 14종 19가지 시료를 메탄올로 추출한 후 계통 분획하여 70종의 ACE 저해효과를 측정하였는데 400 µg/mL 농도에서 ACE 활성을 50% 이상 저해하는 추출물은 16종 이었으며 대부분의 IC₅₀은 300~400 µg/mL 근처의 값을 보였다고 보고한 바 있다. 외국에서는 1960년대 말 독사 (*Bothrops jararaca*)의 독에서 ACE 저해제가 발견되었고, 우유, 대두, 옥수수, 정어리, 참치 등의 단백질 가수분해물, 돼지 혈장에서 분리된 펩티드류, 감귤 및 과실류의 플라보노이드 배당체류, 차성분의 카테킨류, 탄닌 등의 식품에서도 ACE 저해 작용이 발견되었다. 또한, 한약을 비롯한 천연물을 이용하여 신-혈관성 심근 경색을 치료하기 위한 연구가 시도되었는데 Al-Qattan 등²⁹은 마늘 추출물이 2K1C 백서에 대해 ACE 저해효과가 탁월함을 밝힌 바 있고, Inokuchi 등³⁰도 빈랑 추출물이 ACE 저해효과를 나타내었음을 보고한 바 있다. 또한, 국내에서 사용하는 한약재 중 송엽 및 익모초 추출물, 부자 등이 RAS의 의존적인 신-혈관성 심근 경색에 대해 효과적임이 보고되었다. 이러한 결과들로부터 심근 경색 치료제로 이용되고 있는 약제들 중 상당수 약제들이 ACE를 저해함으로써 혈관의 수축 및 이완에 영향을 미쳐 심근경색 유도 동맥경화를 억제할 것으로 사료된다. 따라서, 본 실험에 사용되어진 AR 열수 및 에탄올 추출물 모두 ACE 저해활성이 높게 나타났으므로 이를 계통 분획하여 활성이 있는 성분들을 분리, 정제하는 것은 추후 의미가 있는 연구가 될 것으로 사료된다.

V. 결론

利水滲濕藥로 사용되는 텍사를 열수 및 70% 에탄올로 추출하여 *in vitro* 상에서의 항산화 효과를 TEAC 법에 의한 항산화효과, DPPH를 이용한 유리기 소거효과, ROS 소거효과 및 RNS 소거효과

에 의해 알아본 결과, 70% 에탄올 추출물에 비해 열수 추출물에서 항산화효과가 높게 나타났으며, ROS 소거 보다는 RNS 소거에 효과적으로 작용하였다. 또한, human LDL에 대한 텍사 추출물의 산화 억제효과를 검토한 결과, 대조군으로 사용된 AA 및 BHT 보다는 낮았지만 텍사 열수 및 70% 에탄올 추출물도 비교적 높은 효과를 나타내어 텍사의 우수한 항산화활성이 산화 LDL 내의 지질 과산화물의 축적에 의해 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 세포의존성 동맥경화의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용될 수 있음을 시사하였다. 한편, ACE 저해활성을 분석한 결과, 텍사 열수 추출물 (100 µg/mL)에서 60% 이상의 탁월한 저해효과를 보여 대조군으로 사용된 ACE 저해제로 시판되고 있는 에날라프릴보다는 낮지만 비교적 높은 값을 나타냄을 알 수 있었다. 이상의 실험결과로부터 본 실험에 사용된 텍사는 새로운 항산화·항동맥경화 기능성 소재로의 개발 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*. 2004;327(7):649-62.
2. Perezs DD, Strobel P, Foncea R, Diez MS, Vasquez L, Urquiaga I. et al. Wine, diet, antioxidant defense, and oxidative damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002;957:136-45.
3. Raya, AA, Raya SA. Inflammation: A pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. *Autoimmunity*. 2006;5:331-7.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
5. William OA, Thomas LL, David AW. Renin-angiotensin inhibitors. In *Principles of Medical chemistry*. 4th ed. Baltimore: William & Wilkins; 1995, p. 724.
6. Samy IM, Ashok K, James RS. Mechanisms by Which Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Prevent Diabetes and Cardiovascular Disease. *Am. J. Cardiol.* 2003;91:30H-7H.
7. Brewster UC, Setaro JF, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states. *Am. J. Med. Sci.* 2003;326:15-24.
8. Zalba G, San JG, Moreno MU, Fortuno MA., Fortuno A, Beaumont FJ, et al. Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*. 2001;38:1395-9.
9. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 1st ed. 서울. 신일상사; 2005, p. 503-8.
10. Kim SE, Rhyu DY, Yokozawa T, Park JC. Antioxidant effect of *Alisma plantago-aquatica* var. *orientale* and its main component. *Kor. J. Pharmacogn.* 2007;38(4):372-5.
11. Choi SS. The effects of *Alisma canaliculatum* butanol fraction with selenium on glycogen level, lipid metabolism and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Korean Nutrition Society*. 2004;37(1):15-22.
12. Han HK. Physiological Activity/Nutrition : Effects of *Alisma canaliculatum* butanol fraction with vitamin E on glycogen, lipid levels, and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 2004;36(3):465-71.
13. Toh CA. Antimicrobial and antifungal studies on *Alismae Rhizoma*. *Kor. J. Pharmacogn.* 1996;27(4):378-82.
14. Delledonne M, Polverari A, Murgia, I. The functions of nitric oxide mediated signalling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxid. Redox Signal.*

- 2003;5:33-41.
15. Ali KA, Abdelhak M, George B, Panagiotis K. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic propolis. *Food Chemistry*. 2005;89:27-36.
 16. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner AA. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci*. 1993;84:407-12.
 17. Rivero MDP, Magarino SP, Gonzalez ML. Role of melanoidins in sweet wines. *Analytica Chimica Acta*. 2002;458:169-75.
 18. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*. 1958;26:1199-200.
 19. Yen GC, Chang YC, Su SW. Antioxidant activity and active compounds of rice koji fermented with *Aspergillus candidus*. *Food Chemistry*. 2003;83:49-54.
 20. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004;44:381-6.
 21. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Thrombo Haemost*. 2004;3:254-67.
 22. Wang H, Zhao M, Yang B, Jiang Y, Rao G. Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*. 2008;107(4):1399-406.
 23. Brown JM, Yamamoto BK. Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;99:45-53.
 24. Hogg N, Darley-UVM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J*. 1992;281:419-24.
 25. Raya AA, Raya SA. Inflammation: A pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2006;5:331-7.
 26. Ryu BH. Antioxidative effects of flavonoids toward modification of human low density lipoprotein. *KOREAN J. FOOD & NUTR*. 1999;12(3):320-7.
 27. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: New class orally active antihypertensive agents. *Science*. 1997;196:441.
 28. Kwon JW, Kang DK, Oh HC, Lee HS, Jang KK, Lee JH, et al. Inhibitory effects on angiotensin-converting enzyme of Korean medical plants. *J. Life Sci. & Nat. Res*. 2005;26:84-91.
 29. Al-Qattan KK, Alnaqeob MA, Ali M. The antihypertensive effect of galic (*Allium sativum*) in the rat two-kidney one-clip Goldblatt model. *J. Ethnopharmacol*. 1999:217-22.
 30. Inokuchi J, Okabe H, Yamauchi T, Nagamastu A, Nonaka G, Noshioka I. Antihypertensive substance in seeds of *Areca catechu* L. *Life sciences*. 1986;38:1375-82.