

Moutan Root Bark가 항산화활성과 LDL 산화 억제 및 항혈소판 응집에 미치는 영향

반창규 · 이민자 · 이혜숙 · 정현정 · 김 혁 · 김재은¹ · 박선동² · 박원환*

동국대학교 한의과대학 기초의과학연구소 & 진단학교실, 1: 병리학교실, 2: 방제학교실

Screening of Antioxidative, Anti-thrombotic and Anti-atherosclerotic Effects of Moutan Root Bark Extracts

Chang Kye Ban, Min Ja Lee, Hye Sook Lee, Hyun Jung Jung, Hyuck Kim, Jai Eun Kim¹, Sun Dong Park², Won Hwan Park*

Cardiovascular Medical Research Center and Department of Diagnostics, 1: Department of Pathology, 2: Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

There is currently increased interest in the identification of antioxidant compounds that are pharmacologically potent and have low or no side effects. Plants produce significant amounts of antioxidants to prevent the oxidative stress caused by photons and oxygen, therefore they represent a potential source of new compounds with antioxidant activity. Moutan Root Bark (MRB) has been frequently used as analgesic, antispasmodic, anti-inflammatory and remedies for female diseases. In this study, the antioxidant activity of extract from MRB was studied *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 peroxynitrite] as well as measuring the inhibitory effect on Cu²⁺ induced human LDL oxidation and the inhibitory effect on collagen induced platelet aggregation. The MRB extracts were found to have a potent scavenging activity, as well as an inhibitory effect on LDL oxidation and on platelet aggregation. In conclusion, the MRB extracts have anti-oxidative and anti-atherosclerotic effects *in vitro* system, which can be used for developing pharmaceutical drug against oxidative stress and atherosclerosis.

Key words : Moutan Root Bark(MRB), antioxidative, anti-atherosclerotic, anti-hypertensive

서 론

순환기계질환은 오랜 시간에 걸쳐 서서히 진행되는 퇴행성 질환으로 주로 동맥경화와 관련되어 있다. 동맥경화는 지질대사와 관련된 유전적 요인과 식습관, 흡연, 운동부족 등 환경적 요인에 의하여 동맥이 경화되는 질환이다. 동맥경화의 발병에 관한 가설 중 하나는 '손상에 대한 반응(response-to-injury hypothesis)'으로서 유전적 변이, 과산화물, 고혈압, 당뇨, 혈장 호모시스테인 농도 증가, 미생물 감염 등의 원인에 의하여 혈관 내피세포의 기능부전을 초래한다. 내피세포가 기능부전 상태로 되면 세포부착

물질의 발현이 증가하고 세포 투과성이 증가되어 혈중 면역세포, 혈소판, 지방질 등의 부착 및 조직으로의 투과성이 증가되며, 이들 면역세포들의 염증매개인자 및 성장인자 분비 등 염증반응 때문에 동맥경화성 병변이 발생 및 발달하게 된다는 것이다¹⁾. 이때 혈중 저밀도 지단백질(low density lipoprotein, LDL)이 산화, 당결합, 집적화, 당단백 결합 등의 원인으로 변형-LDL(modified-LDL, MLDL)이 생성되고, 이들은 혈관 내피세포 및 평활근의 자극 및 손상을 유발한다²⁾. 이로 인하여, 내피세포의 혈관세포부착물질-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 발현 및 염증세포의 염증매개인자 방출이 촉진되면 LDL은 내피세포 아래에 유입 및 축적이 되고, 축적된 LDL 및 산화된 MLDL은 다시 대식세포, T 림파구 등 면역세포의 유입 및 활성화를 유발하는 과정을 되풀이하여 병변의 염증반응을 촉진하여 혈전 생

* 교신저자 : 박원환, 경주시 석장동, 동국대학교 한의과대학 진단학교실

· E-mail : diapwh@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2373

· 접수 : 2008/10/27 · 수정 : 2008/11/24 · 채택 : 2008/12/13

성 및 동맥의 경화에 따른 혈류장애 등 순환기 질환을 일으킨다³⁾. 또 다른 가설은 '산화적 스트레스(oxidative stress)'에 의한 것으로 생체 내에서는 에너지 대사를 위해 끊임없이 산화 작용이 일어나며 이 과정 중 상당량의 유리기(free radical)가 생성된다. 이렇게 생성된 유리기는 지질 과산화 반응을 촉진하여 과산화물이 생성되고 이들의 산화·분해 및 중합 반응에 의해 다양한 2차 산물이 생성되어 단백질, DNA, 효소, T-cell과 같은 면역계를 손상, 각종 질환을 야기시키며, 특히 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 생체는 이들 유리기, 즉, 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)으로부터 스스로를 보호하기 위하여 효소적 항산화제로 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) 등의 효소들과 비효소적 항산화제로 비타민 C, 토코페롤, 셀레늄, 요산 등을 가지고 있는데 생체 내 활성산소종·활성질소종과 항산화 방어계(antioxidant defense system) 간의 균형이 깨어질 때 동맥경화와 같은 각종 만성 염증성 질환(chronic inflammatory disease)이 일어나게 된다⁵⁾. 동맥경화의 경우 Kunsch와 Medford의 연구⁶⁾에 따르면 여러 가지 동맥경화의 위험인자들이 혈관세포 내 산화적 스트레스를 증가시키고, 이에 따라 2차적으로 redox sensitive signaling pathway와 transcription factor를 활성화함으로써 혈관세포와 면역세포의 상호작용에 의한 염증을 유발하고, 혈관기능의 장애를 초래하여 동맥경화를 유발한다고 한다. 따라서, 항산화효과가 큰 천연물은 동맥경화와 같은 만성 염증성 질환의 예방 및 치료에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

목단피(牡丹皮, Moutan Root Bark, MRB)는 학명이 *Paeonia suffruticosa* ANDR.,로서 미니리아재비과에 속한 낙엽소관목인 모란의 根皮를 건조한 것으로, 가을에서 초봄 사이에 뿌리를 캐서 수염뿌리와 莖芽를 제거하고 根皮를 剝取하여 건조한다. 뿌리에는 paeonol, paeonoside (paeonoside+arabinose), paeoniflorin이 함유되어 있고, 이 외에 정유 0.15-0.4% 및 phytosterol 등이 함유되어 있다⁷⁾. 清熱涼血, 活血散瘀 등의 효능이 있는 목단피는 항염증 작용, 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호 작용, 허혈성 심질환에서 세포내 Ca²⁺ 상승 억제 및 지질 과산화 억제를 통해 세포 손상을 억제하는 등의 작용이 실험을 통해 입증되었다⁸⁾. MRB에 관한 연구로는 항균활성⁹⁾, ACE 저해 효과¹⁰⁾ 및 항당뇨효과¹¹⁾ 등이 보고되어있다.

따라서, 본 연구에서는 목단피의 항산화효과 및 LDL 산화억제효과를 *in vitro*에서 관찰하고 천연항산화제로서의 개발 가능성을 검토하는 한편, 혈소판 응집 저해효과를 탐색함으로써 동맥경화의 예방 및 치료에의 응용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 시료의 제조

본 실험의 시료로 사용한 목단피(牡丹皮, Moutan Root Bark, MRB)는 2006년산 국산제품을 (주) 옴니허브에서 구입한

후 정선수치하여 사용하였다. 시료 100 g을 마쇄한 후 3 L round flask에 넣고 2 L의 물을 가한 다음 가열맨틀에서 3 hr 전탕 하였다. 이를 1 mm-pore-size filter (Whatman No. 2)로 여과한 후 불용성 물질들은 제거하였다. 여과된 약액은 rotary vacuum evaporator (EYELA Digital water bath SB-1000, EYELA, Japan)를 이용하여 감압농축 한 후 동결건조 하여 18.68 g의 동결건조 분말 시료를 얻었다(수율: 18.68%).

2. 방법

1) TEAC assay에 의한 항산화 효과의 측정

MRB 열수 추출물의 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) 값은 Roberta와 Miller 등^{12,13)}의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 10 µL의 MRB 열수 추출물 희석용액(1,000 µg/mL) 또는 Trolox standard에 ABTS^{•+} 용액 1.0 mL를 첨가하여 1분 후 UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec 6300 pro, Amersham Bioscience)를 이용하여 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 6분간 monitoring하였고 1 mM Trolox와 비교하여 흡광도의 저해 %로 나타내었다.

2) DPPH에 의한 유리기 소거 효과의 측정

MRB의 유리기 소거 효과는 Blois에 의한 방법¹⁴⁾에 따라 측정하였다. 즉, α,α'-diphenyl-β-picryl-hydrazyl (DPPH) 16 mg을 100 mL의 에탄올에 녹인 후 100 mL의 증류수를 혼합하여 여과지로 여과한 후 이 여액 2.5 mL에 일정농도의 MRB 열수 추출물 0.5 mL를 혼합한 후 528nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

3) Superoxide anion 소거 효과의 측정

MRB의 superoxide anion 소거 효과는 Gotoh와 Niki의 방법¹⁵⁾에 따라 측정하였다. 시험관에 일정 농도의 MRB 열수 추출물, 30 mM의 EDTA (pH 7.4), 50 mM의 NaOH에 녹인 30 mM hypoxanthine 및 1.42 mM nitro blue tetrazolium (NBT)을 각각 30µL, 100 µL, 10 µL, 200 µL 첨가하여 강하게 교반하였다. 상온에서 3분간 반응시킨 혼합물에 0.5 U/mL xanthine oxidase 100 µL를 첨가한 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 최종 부피를 3 mL로 조정하였다. 이를 다시 상온에서 20분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) DCFDA assay에 의한 hydroxyl radical 소거 효과의 측정

MRB의 hydroxyl radical의 제거능을 측정하기 위하여 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCFDA) 측정방법¹⁶⁾을 사용하여 측정하였다. 일정 농도의 MRB 열수 추출물 10 µL와 menadione 10 µL를 넣고 potassium phosphate buffer (pH 7.4) 130 µL를 넣어 hydroxyl radical을 생성시킨 후, 125 µM DCFDA에 esterase를 넣어 반응시킨 DCFDH를 50 µL 첨가하여 20분간 생성된 형광의 변화를 측정하였다. 이 형광의 양을 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 Multi-detection microplate reader (Microplate Fluorescence Genius, Tecan, Austria)로 측정하였다.

5) NO radical 소거 효과의 측정

MRB의 NO radical 소거 효과는 DAF-2 assay¹⁷⁾를 이용하여

측정하였다. MRB 열수 추출물 10 μ L와 NO 제공물질인 3-morpholinodisodionimine hydrochloride (SIN-1)과 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2)를 96 well plate에 첨가하였으며, DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 excitation wave length 485 nm 및 emission wave length 530 nm에서 Multi-detection microplate reader를 이용하여 측정하였다.

6) Peroxynitrite 소거 효과의 측정

MRB의 peroxynitrite 소거 효과는 Crow의 방법¹⁸⁾에 따라 측정하였다. 즉, 96-well microplate에 MRB 열수 추출물을 농도별로 취하고 90 mM NaCl₂, 5 mM KCl 및 100 μ M diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μ M DHR 123를 함유하는 sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하였다. 이에 10 μ M ONOO⁻를 첨가한 후 형광광도계를 이용하여 excitation 500 nm, emission 536 nm에서 측정하였다.

7) RT-PCR에 의한 항산화효소계 활성 측정

농도별 MRB 열수 추출물을 24시간 처리한 HepG2 세포로부터의 total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용하였으며, RNase-free한 조건 하에서 이루어졌다. 역전사 효소 반응은 Promega사에서 제공된 manufacture에 따라 DNase의 처리 및 reverse transcription 과정을 순차적으로 실시하였으며, 과정은 다음과 같다. 먼저 2 μ L의 RNA를 DNase와 섞고 DNA 제거 효소를 37°C에서 30분 동안 활성화 시켰다. 반응이 종료한 뒤 75°C에서 DNase를 불활성화 시킨 후 역전사 반응을 진행 하였다. 역전사 반응에서는 주형인 RNA와 oligo dT primer를 섞고 70°C에서 5분간 반응을 전개시킨 후 4°C에서 5분 동안 정지하였다. 다음으로 RNA inhibitor (1 unit/ μ L)가 포함된 15 μ L의 조성물과 미리 oligo dT와 반응을 시킨 5 μ L의 RNA 주형을 혼합하여 25°C에서 5분간 anneal하고, 42°C에서 60 분동안 extension 과정을 거친 후 마지막으로 70°C에서 15분 동안 heat-inactivate 하였다. 합성이 완료된 cDNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 이용하였다. PCR 과정을 수행하기 위한 조건으로 Table 1과 같은 primers를 제작하였다.

8) Relative Electrophoretic Mobility (REM)의 측정

Human LDL의 REM은 윤 등¹⁹⁾의 방법에 따라 agarose gel electrophoresis로 분석하였다. 간단히, PBS (pH 7.4)에 녹인 LDL (120 μ g/mL)을 일정 농도의 MRB 열수 추출물, 10 μ M CuSO₄와 혼합하여 37°C에서 12 시간동안 배양 한 후, 3 μ g의 LDL을 0.7% agarose gel에 loading하여 TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, and 1mM EDTA)에서 85 V로 1시간 동안 전기영동하였다. Gel은 건조하여 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하였고, 샘플의 inhibition ratio (%)는 다음 식에 의해 계산하였다.

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

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

9) Human LDL 산화 억제효과의 측정

MRB 추출물의 human LDL 산화 억제효과는 Yagi의 방법²⁰⁾

에 의해 측정하였다. 즉, human LDL 0.5 mL에 10 mM PBS buffer (pH 7.4)를 1.5 mL, 0.1 mM CuSO₄ 40 μ L 및 용매 또는 시료 40 μ L를 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 \times 에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 기포를 제거한 후 532 nm에서 흡광도를 측정한다.

10) Fibrinolytic clear zone의 측정

MRB 열수 추출물의 혈전에 대한 분해활성은 human fibrin plate를 이용하여 Astrup와 Mullertz의 방법²¹⁾을 토대로 측정하였다. 100 mm petri dish에 thrombin 용액(50 unit/mL)을 100 μ L 주입한 후, 여기에 0.1 M phosphate (pH 7.5) buffer에 0.5%(w/w)가 되도록 녹인 fibrinogen 용액 5 mL를 주입하고 잘 섞어주었다. Fibrin이 굳을 때까지 실온에서 30분간 방치하여 fibrin plate를 제작하였다. 제작된 fibrin plate의 중앙에 MRB 추출물 0.2 g을 놓고 37°C에서 20시간까지 반응을 행하며 lysis zone의 직경을 측정하였다.

11) 혈소관 응집 억제활성의 측정

MRB의 혈소관 응집 억제활성을 검색하기 위하여 aggregometer (Chrono Log 490-2D, Chrono Log, USA)를 이용하여 혈소관 응집 억제활성을 impedance 법으로 측정하였다. 먼저, Sprague Dawley (SD) male rat의 혈액을 3.8% sodium citrate 항응고제가 포함되어 있는 vacutainer (BD 363048, Becton Dicknson, UK)에 채혈한 후, 1,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상등액(platelet rich plasma, PRP)을 분리하여 2,300 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 침전물(platelet rich pellet)을 washing buffer (pH 6.5)로 두 번 세척하고, 2,300 rpm에서 10분간 재원심분리 하였다. 상등액(platelet poor plasma, PPP)을 제거한 후, suspending buffer (pH 7.4)로 부유하여 2,300 rpm으로 10분간 세정한 후 혈소관 수가 4~5 \times 10⁸ cells/mL이 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. Washing buffer의 조성은 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaH₂CO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM Glucose 및 1 mM EDTA이며, suspending buffer의 조성은 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaH₂CO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM Glucose, 0.49 mM MgCl₂ 및 0.25% Gelatin이다. Cuvette에 PRP 400 μ L, agonist인 collagen 50 μ L, sample μ L를 넣고, 항혈전작용을 평가하였다. 혈소관 활성화 억제작용은 collagen으로 유도된 aggregation (%)을 대조군(A)으로, MRB 열수 추출물을 전처리한 후 유도된 aggregation (%)을 시료군(B)으로 하여 다음 계산식에 따라 inhibition (%)로 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: control aggregation (%), B: sample aggregation (%)

12) 통계처리

통계 분석은 SPSS (version 14.0 for Windows, SPSS Inc., USA) 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.

Table 1. Primer set list for polymerase chain reaction

Genes	Sequences
SOD1	5'-AGGGCATCATCAATTCGAG-3'
	5'-ACATTGCCCAAGTCTCCAAC-3'
SOD2	5'-AGCACTAGCAGCATGTTGAG-3'
	5'-ACTTCTCCTCGTTGACGTTTC-3'
GPx	5'-GTACGGAGCCCTCACCATT-3'
	5'-AGCCCAAGAATGACCAGACC-3'
GR	5'-TTACTGCAGTCCCGGTAGG-3'
	5'-CAGCAGCTATTGCAACTGGA-3'
Cata:ase	5'-CCCTCTCATCCAGTTGGT-3'
	5'-TAGTTGGCCACTCGAGCAC-3'
GAPDH	5'-GGAAGGACTCATGACCACAG-3'
	5'-TTGGCAGGTTTTTCTAGACG-3'

결과 및 고찰

1. TEAC assay에 의한 MRB의 항산화 효과

TEAC법은 혈장이나 혈청의 항산화 효과뿐만 아니라 항산화 효과 측정에 현재 가장 광범위하게 사용되는 방법으로 2,2'-azinobis 3-ethylbenzo-thiazoline 6-sulfonate (ABTS^{·+})의 양이온 라디칼을 소거하는 항산화제의 능력을 수용성 비타민 E analogue인 Trolox와 비교함으로써 평가한다²²⁾. MRB 열수 추출물의 항산화 효과를 TEAC법으로 측정된 결과, Table 2에 나타내었듯 MRB 열수 추출물의 TEAC 값은 0.053±0.001로 나타났다. 반면 대조군으로 사용한 ascorbic acid (AA)와 butylated hydroxytoluene (BHT)의 TEAC 값이 각각 0.327±0.001과 1.217±0.002로 나타났는데 MRB 추출물이 이들 시료와 비교하여 ABTS^{·+} 소거 활성은 다소 낮은 것으로 판단되었다.

2. MRB의 DPPH에 의한 유리기 소거 효과

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 산화적 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 이용된다. DPPH는 안정한 라디칼로 cysteine, glutathione과 같은 함유황 아미노산과 ascorbic acid, tocopherol, hydroquinone, pyrogallol과 같은 polyhydroxy aromatic compounds, p-phenylenediamine, p-aminophenol과 같은 aromatic amine 등에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되므로 수소 공여능 또는 유리기 소거 작용을 측정하는데 널리 사용되고 있는 편리한 방법이다²³⁾. 본 연구에서 DPPH를 이용하여 MRB 열수 추출물의 유리기 소거효과를 측정된 결과는 Table 2와 같다. MRB 열수 추출물의 유리기 소거효과는 IC₅₀값이 412.18±10.37 µg/mL로 대조군으로 쓰인 AA 및 BHT 보다는 높게 나타났다. 항암작용, 항산화 작용 등 다양한 기능이 있다고 보고된 10종의 식용버섯 및 약용버섯의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타낸 Kim 등²⁴⁾의 연구에서는 표고버섯 19.9%, 차가버섯 44%, 꽃송이버섯 37.2%, 영지버섯 69.9%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 또한 catechin 류에 의해 대표적인 항산화 물질로 알려진 녹차의 DPPH 라디칼

소거 활성이 50.6%로 보고되었다²⁵⁾. 따라서, MRB 열수 추출물이 앞서 언급한 추출물에 비해 저농도에서 50% 소거활성을 나타내어 우리에게 잘 알려진 약용식물이나 항산화 효과로 알려진 녹차에 비하여 유리기 소거활성이 뒤지지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 2. Antioxidant activities of the extract of MRB as determined by the ABTS^{·+} assay and DPPH assay

	MRB	Positive control	
	W ^a	AA	BHT
TEAC (mM Trolox equivalent)	0.053±0.001 ^c	0.327±0.001	1.217±0.002
DPPH radical scavenging activities (IC ₅₀ =µg/mL)	412.18±10.37 ^c	162.80±9.64	191.15±10.12

a: W, water extract. b: Each value represents the mean ± SE of triplicate measurements

3. MRB의 ROS 및 RNS 소거 효과

Superoxide anion은 선택적 반응성을 지닌 산소가 중심에 위치해 있는 라디칼로 생물학적 거대분자와 반응할 수 있는 singlet oxygen, hydroxyl radical 등을 활성화시킴으로써 조직손상을 야기할 수 있고, 직접적으로 지질과산화물을 개시하기도 한다²⁶⁾. MRB 열수 추출물의 superoxide anion 소거 효과를 측정하기 위해 NBT 환원법을 이용하였다. 이 방법은 xanthine oxidase에 hypoxanthine을 첨가하여 생성된 superoxide anion이 노란색의 NBT를 환원시켜 청색의 diformazan으로 변화시킴으로써 560 nm에서 흡광도가 증가되게 된다. 이때, superoxide anion 소거 활성을 갖는 물질을 첨가하면, NBT의 환원을 감소시켜 diformazan의 생성 역시 감소하게 된다²⁷⁾. MRB 열수 추출물의 superoxide anion 소거 활성을 측정된 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 IC₅₀값이 0.43±0.03 mg/mL로 항산화효과가 널리 알려진 AA (IC₅₀=1.22±0.02 mg/mL) 보다는 탁월하게 우수한 소거 활성을 나타내어 superoxide anion에 대해 효과적인 소거제로 작용하는 것으로 나타났다.

Hydroxyl radical은 가장 반응성 있는 유리기로 근접한 biomolecule에 치명적인 손상을 입힌다. 이 molecule은 구리, 철과 같은 금속이온 존재 시 superoxide anion과 hydrogen peroxide에 의해 생성되어 지질, 폴리펩타이드, 단백질 및 DNA와 반응하는데, 특히 thiamin과 guanosine과 더욱 더 빠르게 반응하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 따라서, 천연물에 존재하는 hydroxyl radical 소거제를 검색하는 것은 여러 다양한 질환을 예방하는 차원에서 중요한 의미가 있다. Dye의 산화로부터 생성되는 형광을 측정함으로써 microsome과 ester DCFDA와의 상호 반응성을 측정하는 DCFDA assay는 microsome의 산소 라디칼 생성을 자극하는 ferritin의 활성을 평가하기 위한 빠르고, 보다 더 민감한 시스템이다²⁹⁾. MRB 열수 추출물의 hydroxyl radical 소거 효과를 측정된 결과, IC₅₀값이 102.87±10.24 µg/mL로 나타나 강력한 항산화제로 알려져 있는 AA (IC₅₀=59.79±2.96 µg/mL) 보다는 낮지만 hydroxyl radical에 대한 소거 활성을 갖는 것으로 나타났으며(Table 3), 따라서 MRB는 hydroxyl radical을 효과적으로 소거하여 microsome의 지질과산화물을 억제시킬 것으로

사료되었다.

Nitric oxide (NO) radical은 무기 저분자 라디칼로서 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등의 역할이 알려져 있다. 과량의 NO는 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜 prostaglandin E₂의 생합성을 유도하여 염증반응을 심화시키고 패혈증 환자에게서 septic shock을 일으키는 것으로 보고되었다³⁰⁾. RNS 중 하나인 nitric oxide radical에 대한 MRB의 소거 활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. MRB 열수 추출물의 IC₅₀값은 1.52±0.04 µg/mL로 탁월하게 높은 NO radical 소거 활성을 보인데 반해, 대조군으로 이용된 AA (IC₅₀=59.79±2.96 µg/mL)는 MRB에 비해 현저히 낮은 소거 효과를 보였다. 이러한 MRB의 라디칼 소거효과는 ROS보다 RNS의 소거에 더 탁월한 효과를 보이는 것으로 사료되었다.

또 다른 RNS 중 하나인 peroxynitrite는 과량의 NO와 superoxide anion에 의해 생성되어 단백질 및 지질의 과산화를 유발하고, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis 등의 중추 신경계 질환을 유발한다고 알려져 있다. 이와 같이 NO는 NO 자체로서 보다는 peroxynitrite의 형태로 다양한 산화적 손상을 유발하며, 일단 생성된 NO는 ONOO⁻의 형태로 조직 손상을 일으키므로, NO에 의한 다양한 질환을 예방 또는 치료하기 위해서는 ONOO⁻를 소거할 수 있는 물질이 유용하다. *In vitro*에서 가장 강력한 peroxynitrite 소거제로는 D(-)-penicillamine과 ebselen이 있고, 그 외 과일, 와인, 차, 녹황색 채소의 성분으로서 효과적인 항산화제로 알려져 있는 ascorbic acid, α-tocopherol, flavonoids, polyhydroxyphenol 등이 있다³¹⁾. 본 실험은 peroxynitrite 소거는 실험으로 MRB 추출물이 RNS의 생성을 효과적으로 방지 할 수 있는지를 살펴보고자 MRB의 ONOO⁻ 소거 활성을 DHR 123을 이용하여 측정하였다. MRB 열수 추출물(IC₅₀=4.35±0.13 µg/mL)의 peroxynitrite 소거 효과는 대조군으로 사용된 AA (IC₅₀=2.54±0.04 µg/mL) 보다 는 낮았으나 비교적 높은 소거 효과를 보여, MRB가 효과적인 peroxynitrite 소거제로 작용함을 알 수 있었다(Table 3).

Table 3. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species scavenging activities of the extract of MRB

	MRB	Positive control	
	W ^a	AA	BHT
Superoxide anion scavenging activities (IC ₅₀ =mg/mL)	0.43±0.03 ^b	1.22±0.02	NA ^c
Hydroxyl radical scavenging activities (IC ₅₀ =µg/mL)	102.87±10.24 ^b	59.79±2.96	NA ^c
Nitric oxide radical scavenging activities (IC ₅₀ =µg/mL)	1.52±0.04 ^b	59.79±2.96	NA ^c
Peroxyntirite scavenging activities (IC ₅₀ =µg/mL)	4.35±0.13 ^b	2.54±0.04	572.41±28.90

a: W, water extract; AA, ascorbic acid. b: Each value represents the mean ± SE of triplicate measurements. c: NA is not active.

4. RT-PCR을 통한 MRB의 항산화효소계 활성 변화

산화적 스트레스란 ROS 또는 RNS와 항산화방어계 간의 불

균형 상태일 때 발생하며, 심장 기능이상, 죽상동맥경화, 염증, 암, 약물 독성, 허혈성 질환 및 여러 퇴행성 질환에 관여한다. ROS 및 RNS는 단백질, 지질 DNA, 당질 및 다가불포화지방산 등의 거대분자를 공격하고 그 결과로 급속한 세포사멸을 초래하게 된다. 산화적 스트레스에 의한 손상을 감소시키기 위해 효소계 및 비효소계 항산화 시스템과 같은 내인성 방어계가 작용하는 것으로 알려져 있다. 항산화 시스템은 ROS 및 RNS에 의한 손상을 감소시킬 뿐만 아니라, 세포 항상성을 유지하고 redox signal transduction을 가능케 하는데 이러한 시스템은 완벽하지는 않다. 항산화 효소계 발현에 대한 여러 가지 의견들이 있으나, 산화적 스트레스가 가해질 때, 이로 인한 손상을 줄이기 위해 항산화 효소계 발현이 증가하는데 항산화제 투여 시에는 이들이 산화적 스트레스를 소거하게 되므로 항산화 효소계의 발현이 오히려 감소된다는 설이 있다^{32,33)}. 본 연구에서 HepG2 세포에 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발한 뒤 MRB 열수 추출물을 처리하여 세포의 산화적 손상 및 항산화효소의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 Cu·Zn-SOD, GPx 및 catalase의 mRNA 발현 양상에는 큰 변화가 나타나지 않았으나 GR의 mRNA 발현에 있어 HepG2 세포에 H₂O₂를 처리하였을 때, 항산화효소 활성이 현저히 감소되었으나 MRB 열수 추출물을 처리하였을 경우 농도에 의존적으로 항산화효소 활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 MRB는 산화적 스트레스로부터의 세포내 손상을 효과적으로 방어하는 것으로 사료된다.

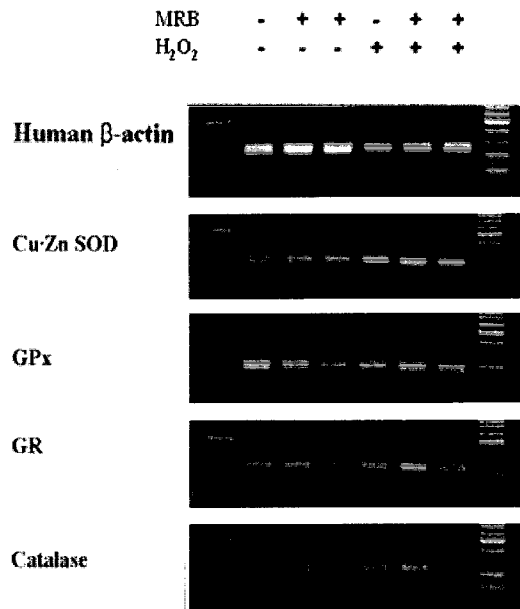


Fig. 1. Effects of MRB on hepatic antioxidative enzymes(SOD, GPx, GR and catalase) mRNAs expression after H₂O₂ exposure in HepG2 cells by RT-PCR. A PCR blot of antioxidant enzyme mRNAs obtained by RT-PCR after exposure of HepG2 cells to indicated concentrations of H₂O₂ for 24 hrs. Lane 1,8: M, step-ladder marker; Lane 2: Control; Lane 3,4: 5, 10 µg/mL of MRB; Lanes 5: 1 mM of H₂O₂; Lanes 6,7: 1 mM of H₂O₂ + 5, 10 µg/mL of MRB

5. REM assay를 통한 MRB의 LDL 산화 억제효과

LDL은 혈장 단백질 중 밀도가 1.025~1.058에 해당하는 저

단백으로 외부는 소수성의 triglyceride cholesteryl ester로 둘러싸여 있으며, 중심부는 극성인 인지질과 유리 콜레스테롤로 이루어져 있다. 외부는 apo B-100이라 불리는 특수한 단백질로 구성되어 있는데 이 apo B-100은 LDL에서 모노머 단백질로 존재하며 인체 내 혈관에서 콜레스테롤의 조절 및 대사에 직접 관여한다. 또한, apo B-100은 LDL-receptor에 결합할 수 있는 ligand로 작용한다. 정상적인 LDL은 산화적 스트레스에 의해 쉽게 산화되어 LDL-receptor와 결합하지 못한다. LDL 산화는 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 주요한 역할을 하며, ox-LDL이 정상적인 LDL 보다 대식세포에 의해 쉽게 포획되어 거품세포를 형성함으로써 동맥경화를 유발한다³⁴⁾. REM assay는 apo B-100에 있어서의 산화적 손상을 직접적으로 측정하는 방법으로, Fig. 2는 Cu²⁺에 의해 유도되는 LDL 과산화의 REM에 대한 MRB의 효과를 보여주고 있다. Native LDL의 REM을 1이라고 가정했을 때, Cu²⁺ 첨가에 의해 REM이 3.1까지 증가하였고, MRB 열수 추출물 첨가에 의해 1, 10 µg/mL 농도에서 각각 2.9, 1.4까지 감소되어 11.76%, 82.3%의 LDL 산화 보호효과를 나타내었다.

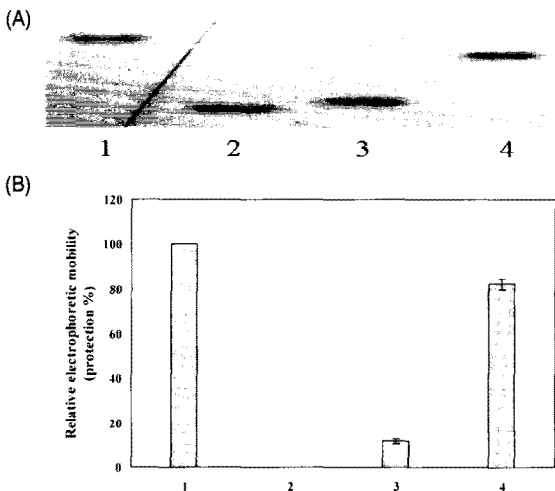


Fig. 2. The relative electrophoretic mobility (REM) of human LDL incubated with Cu²⁺ and with or without extracts of MRB. LDL (120 µg/mL) was oxidized with 10 µM CuSO₄ at 37°C in the presence of MRB extracts for 12 h. (A) Lane 1: native LDL; Lane 2: LDL and Cu²⁺; Lane 3: LDL and Cu²⁺ and 1 µg of MRB; Lanes 4: LDL and Cu²⁺ and 10 µg of MRB. (B) Protection rate (%). Each value represents the mean ± SE of triplicate measurements.

6. MRB의 human LDL 산화 억제효과

혈액 중의 저밀도지단백질 (LDL)은 cholesteryl ester의 운반체로서 금속이온, macrophage 등에 의해 산화되면 cholesteryl ester가 증가하여 높은 세포 독성이 있는 유해산소, 유리기 및 과산화물이 생성됨으로써 이들이 세포조직에 확산되어 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 산화된 LDL은 생리활성 물질을 분해하고 내피세포에 염증을 일으켜 혈전 및 갑술 침착으로 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다³⁵⁾. CuSO₄ 유도-LDL 산화 억제 효과에 대한 MRB의 효과를 검토한 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 MRB 열수 추출물은 IC₅₀값이 43.17±1.13 µg/mL로 대조군으로 사용된 AA (IC₅₀=21.09±0.62 µg/mL) 및 BHT

(IC₅₀=26.31±0.22 µg/mL)보다는 낮았으나, 비교적 높은 효과를 나타내었다. Chen 등³⁶⁾은 *Glycine tomentella* 뿌리 에탄올 추출물에서 LDL 산화 억제효과를 측정한 결과 유의적으로 lag phase를 지연시킴으로써 *Glycine tomentella*가 생체 내에서 산화적 스트레스에 의해 유발되는 손상과 그로 인한 질병유발을 예방하는데 좋은 소재가 될 수 있음을 시사한 바 있다. 이상의 결과로 본 실험에 이용한 MRB의 강력한 항산화활성을 바탕으로 산화 LDL 내의 지질 과산화물의 축적 억제를 통해 MRB가 동맥경화 예방 소재로의 개발 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

7. Fibrinolytic clear zone의 측정

Fibrin과 혈소판 응집으로 형성되는 혈전은 혈관벽에 축적되어 동맥경화나 심근경색 뿐만 아니라 뇌출혈, 뇌혈전증, 심부전증 및 심장마비 등의 원인이 될 수 있다. 혈전으로 유발되는 질병의 예방 및 치료는 fibrin 섬유소 용해 및 혈전 축소 기능을 갖는 혈전용해제를 사용함으로써 가능하다. 지금까지 사용되고 있는 혈전용해제는 주로 tPA로서 이 용해제의 단점으로는 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생하며 또한 가격이 비싸다는 것이 지적되고 있다. 이에 최근 천연물로부터 혈전용해 활성을 갖는 물질의 분리 및 동정에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{37,38)}. 본 연구에서 MRB 열수 추출물의 혈전분해 활성을 평가한 결과, MRB는 fibrin plate 상에서 fibrin clot을 효과적으로 분해하였다(Fig. 3). 또한, 이를 정량화하기 위하여 반응시간 20시간이 경과한 후에 분해된 fibrin의 무게를 측정하였다. 반응시작 15시간이 경과된 후 혈전 분해량이 눈에 띄게 증가하였으며 20시간 후에는 약 1,892 mg의 분해된 혈전을 얻을 수 있었다. 따라서 MRB는 항산화·항염증 기작에 의한 혈전 분해능이 탁월한 것으로 관찰되었다.

Table 4. Inhibitory effect on Cu²⁺-induced LDL oxidation of the extract of MRB

	MRB	Positive control	
	W ^a	AA	BHT
inhibitory effect on Cu ²⁺ -induced LDL oxidation (IC ₅₀ = µg/mL)	43.17±1.13 ^b	21.09±0.62	26.31±0.22

a: W, water extract; AA, ascorbic acid; b: Each value represents the IC₅₀, mean ± SE of triplicate measurements.

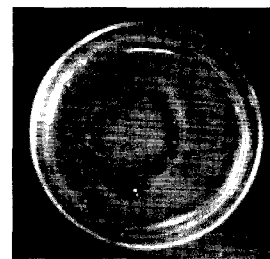


Fig. 3. Fibrinolytic activity of MRB by fibrin-plate assay.

8. 혈소판 응집 억제활성의 측정

혈소판은 복잡한 내부구조를 갖는 미세한 혈중 세포로서 정상적인 혈관 내피에는 부착하지 않으나 내피의 손상 등 여러 가지 자극에 의하여 손상된 내피에 부착하거나 또는 혈소판 자체

끼리의 응집을 일으킨다. 또한 이때 혈소판 내부로부터 adenosine 5'-diphosphate (ADP), thromboxane A₂ 등의 혈소판 응집 유도 물질을 분비함으로써 더욱 응집을 촉진시킨다. 이와 같은 성질에 의하여 혈소판은 혈관벽에 상처가 생겼을 때 혈전괴(platelet plug)를 형성하여 급속한 혈액의 손실을 방지하는 일차 방어 기능을 갖는 중요 세포이다. 그러나 비정상적인 혈소판의 활성화는 혈소판 응집 및 혈전형성을 초래하여 폐쇄성 혈관 질환의 임상적 발현에 관여하게 된다. 또한 혈소판에서 유리된 물질들은 혈관수축, 염증 및 동맥경화성 혈관질환 등에도 관여하고 있음이 알려져 있다^{39,40}. 따라서, 혈행 개선과 관련한 MRB의 *in vitro* 실험적 효능평가방법으로 혈소판 응집 억제능을 실시하였다. 농도별 MRB 열수 추출물에 대한 혈소판 응집억제활성을 측정한 결과, 음성대조군으로 혈소판에 증류수만을 처리하였을 때는 5분 동안 19.04%의 혈소판 응집률을 보였고, 양성대조군으로 혈소판, 증류수 외에 혈소판 응집제인 collagen을 첨가하였을 때는 94.58%의 응집률을 보였다. MRB 열수 추출물을 최종 농도 1, 2, 5 µg/mL로 처리했을 때, 각각 88.26%, 79.84%, 37.53%의 혈소판 응집률을 보여 농도 의존적 응집 억제효과를 나타내었다. 또한 잘 알려진 혈소판 응집 억제 물질인 eugenol을 처리했을 때, 혈소판 응집률이 25.68%로 약 75%의 응집 억제효과를 보여 MRB가 eugenol 보다는 다소 낮지만 우수한 억제효과를 보여 동맥경화 및 고혈압의 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

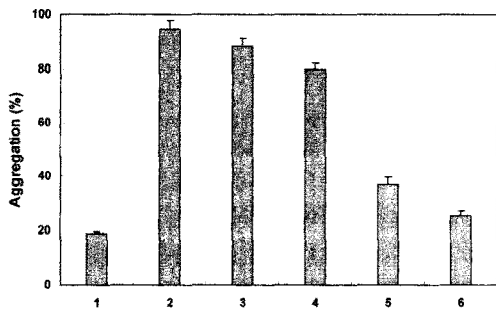


Fig. 4. Effects of the extract of MRB on the platelet aggregation induced by collagen. 1. Platelet rich plasma (PRP) 400 µL + D.W 50 µL; 2. PRP 400 µL + D.W 50 µL + collagen 50 µL (100 µg/mL); 3. PRP 400 µL + collagen 50 µL (100 µg/mL) + MRB 10 µL (50 µg/mL); 4. PRP 400 µL + collagen 50 µL (100 µg/mL) + MRB 20 µL (50 µg/mL); 5. PRP 400 µL + collagen 50 µL (100 µg/mL) + MRB 50 µL (50 µg/mL); 6. PRP 400 µL + collagen 50 µL (100 µg/mL) + eugenol 50 µL (50 µg/mL).

결론

活血祛瘀劑로 사용되는 MRB를 열수 추출하여 *in vitro* 상에서의 항산화 효과를 TEAC법에 의한 항산화효과, DPPH를 이용한 유리기 소거효과, ROS (superoxide anion, hydroxyl radical) 소거효과 및 RNS (NO radical, peroxyntirite) 소거효과에 의해 알아본 결과, 모든 실험에 대해 항산화효과가 높았으며, 특히 RNS 소거활성이 큰 것으로 나타났다. 또한, MRB 열수 추출물이 항산화효소계(Cu·Zn-SOD, GPx, GR 및 catalase) mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR에 의해 살펴본 결과, MRB는 산화적

스트레스로부터의 세포내 손상을 효과적으로 방어하며 항산화효소계의 이상 발현을 억제시키는 것으로 사료되었다. 한편, human LDL에 대한 MRB 열수 추출물의 산화 억제효과를 검토한 결과, 대조군으로 사용된 AA 및 BHT 보다는 낮았지만, 비교적 우수한 효과를 보여 MRB의 우수한 항산화활성이 산화 LDL 내의 지질 과산화물의 축적에 의해 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 세포의존성 동맥경화의 초기단계를 예방할 수 있는 가능성 물질로 이용될 수 있음을 시사하였다. MRB 열수 추출물의 혈전분해 활성을 fibrin plate 상에서 관찰한 결과, 20 시간 경과 후에 유의적으로 fibrin 분해량이 증가하는 결과를 확인할 수 있었으며, 농도별 MRB 열수 추출물에 대한 혈소판 응집억제 활성을 측정한 결과, collagen 유도 혈소판 응집에 대해 농도의 의존적 응집 억제효과를 나타내었다. 또한, 혈소판 응집 억제 물질인 eugenol을 처리했을 때와 비교하여 MRB가 eugenol과 유사한 억제효과를 보여 동맥경화 및 고혈압의 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 기대되었다. 이상의 실험결과로부터 본 실험에 사용된 MRB는 새로운 항산화·항혈전 효과에 의한 항동맥경화 가능성 소재로의 개발 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초과학연구센터 육성사업 (grant #: R13-2005- 01001-0) 및 동국대학교 학술지원 사업비의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

- Ross, R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. New Engl. J. Med. 340(2):115-126, 1999.
- Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J. Biol. Chem. 272: 20963-20966, 1997.
- Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman A.M., Lusis, A.J. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. Nature, 344(6263):254-257, 1990.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 47: 412-426, 1982.
- Perezs, D.D., Strobel, P., Foncea, R., Diez, M.S., Vasquez, L., Urquiaga, I., Castillo, O., Cuevas, A., San Martin, A., Leighton, F. Wine, diet, antioxidant defense, and oxidative damage. Ann. N. Y. Acad. Sci. 957: 136-145, 2002.
- Kunsch, C., Medford, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. Circ Res. 85(8): 753-766, 1999.
- 전국한의과대학본초학교수 공편저. 본초학. 영림사, p 194,

- 2000.
8. 한방약리학 교재편찬위원회 저. 한방약리학. 신일상사, pp 145-148, 2006.
 9. Seon, H.J., Han, Y.S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Mokdan Bark (*Paeonia suffruticosa* ANDR). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32(7): 1059-1065, 2003.
 10. Choi, G.P., Chung, B.H., Lee, D.I., Lee, H.Y., Lee, J.H., Kim, J.D. Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. *J. Medicinal Crop Sci.* 10(5):399-402, 2002.
 11. Lau, C.H., Chan, C.M., Chan, Y.W., Lau, K.M., Lau, T.W., Lam, F.C., Law, W.T., Che, C.T., Leung, P.C., Fung, K.P., Ho, Y.Y., Lau, C.B.S. Pharmacological investigations of the anti-diabetic effect of Cortex Moutan and its active component paeonol. *Phytomedicine*, 14(11):778-784, 2007.
 12. Roberta, R.E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*, 26: 1231-1237, 1999.
 13. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A.A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84: 407-412, 1993.
 14. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*, 26: 1199-1200, 1958.
 15. Gotoh, N. and Niki, E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochem. Biophys. Acta*, 1115: 201-207, 1992.
 16. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview. *Method Enzymol.* 186: 1-85, 1990.
 17. Nagata, N., Momose, K., Ishida, Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J. Biochem. Tokyo*, 125: 658-661, 1999.
 18. Crow, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydro rhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*, 1: 145-157, 1997.
 19. Yoon, M.A., Jeong, T.S., Park, D.S., Xu, M.Z., Oh, H.W., Song, K.B., Lee, W.S., Park, H.Y. Antioxidant effect of quinoline alkaloid and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 735-739, 2006.
 20. Yagi, K.A. Simple fluometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 212-216, 1976.
 21. Astrup, T., Mullertz, S. The fibrin method for estimating of fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40: 346-351, 1952.
 22. Miller, D.D. Mineral, in: O.R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York, pp 618-649, 1996.
 23. Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Analytica Chinica Acta*, 558: 310-318, 2006.
 24. Kim, M.Y., Ahn, J.K., Jung, W.S., Chung, I.M. Comparison of the SOD and DPPH activity, L-amino acid contents on edible mushrooms and medicinal mushrooms. *Korean J. Med. Crop Sci.* 51: 330-331, 2006.
 25. Hassan, O., Fan, L.S. The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM). *LWT-Food Sci. Technol.* 38: 315-321, 2005.
 26. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.* 219: 1-4, 1984.
 27. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non distilled Mediterranean herbs and aromatic plants, *J. Agric. Food Chem.* 50: 6882-6890, 2002.
 28. Wrona, M., Patel, K., Wardman, P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydro rhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radical Bio Med*, 38(2): 262-270, 2005.
 29. Wang, H., Zhao, M., Yang, B., Jiang, Y., Rao, G. Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*, 107(4):1399-1406, 2008.
 30. Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G., Needleman, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7240-7244, 1993.
 31. Rubbo, H., O'Donnell, V. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology*, 208: 273-288, 2005.
 32. Schmitz, G., Grandl, M. Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during Ox-LDL-mediated foam cell formation. *Antioxid Redox Signal.* 9(9):1499-1518, 2007.
 33. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91: 179-194, 2003.
 34. Fredrikson, G., Bjorkbacka, H., Ljungcrantz, I., Soderberg,

- I., Chyu, K.Y., Shah, P., Nilsson, J. Inhibition of atherosclerosis by apo B peptide vaccins in LDL receptor deficient mice expressing human apo B-100. *Atherosclerosis Supplements*, 9(1):38-39, 2008.
35. Raya, A.A., Raya, S.A. Inflammation: A pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 5: 331-337, 2006.
36. Chen, T.Y., Pan, B.S. Ex vivo inhibitory effect on tilapia LDL oxidation and hypolipidemia properties of Glycine tomentella root extract. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 148: 189-195, 2007.
37. Zhao, J., Qi, S.P., Wu, J., Li, L., He, R.Q. Earthworm fibrinolytic enzyme. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30: 825-847, 2005.
38. Hahn, B.S., Wu, S.J., Kim, S.W., Kim, Y.S. Evaluation of anticoagulant fibrinolytic activities from crude extracts of insects. *Kor. J. Pharmacogn.* 30: 409-412, 1999.
39. Packham, M.A. Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can. J. of Physiol. Pharmacol.* 72: 278-284, 1994.
40. Shah, H.D., Goyal, R.K. Glycoprotein IIb/IIIa receptor and its inhibition: A platelet-directed therapeutic strategy. *Indian J. of Pharmacol.* 36: 133-139, 2004.