GLEDITSIAE SPINA 에탄올 추출물 및 분획물이 산화적 스트레스와 human LDL 산화억제에 미치는 영향

김 혁 · 이민자 · 이혜숙 · 정현정 · 최성규 · 이창섭 · 박원환*

동국대학교 한의과대학 기초의과학연구센터 & 진단학교실

Preventive Effects of *GLEDITSIAE SPINA* Ethanol Extracts and its Fraction on Oxidative Stress and Human LDL Oxidation

Hyuck Kim, Min Ja Lee, Hye Sook Lee, Hyun Jung Jung, Sung Kyu Choi, Chang Sub Lee, Won Hwan Park*

Cardiovascular Medical Research Center and Department of Diagnostics, College of Korean Medicine, Dongguk University

GLEDITSIAE SPINA (GS) has been used as folk remedies traditionally for treatment of antiphlogistic and antifebrile agents. An ethanol extract and its fraction of GS were assessed to determine the mechanism of its antioxidant activity. Also, inhibitory effect of extract from GS and its fraction measuring the inhibitory effect on Cu^{2+}-induced human low-density lipoprotein (LDL) oxidation. GS ethanol extract and its fraction exhibited a concentration-dependent reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) scavenging activities, including trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), DPPH radical, superoxide anion, hydroxyl radicals, peroxynitrite and nitric oxide, using different assay systems. Furthermore, the GS ethanol extract and its fraction showed dose-dependent protection of LDL oxidation induced by $CuSO_4$. In addition, the GS ethanol extract and its fraction were characterized as containing a high amount of total phenolics. These results suggest that GS ethanol extract and its fraction might be helpful for preventing oxidative stress and protecting LDL oxidation.

Key words : *GLEDITSIAE SPINA* (GS), antioxidant, low-density lipoprotein (LDL), reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS)

서 론

皂角刺(*GLEDITSIAE SPINA*)는 콩과(Leguminosae) 皂莢의 줄기에 난 가시를 말하며 本經衍義補遺에 처음 수록되어 있으며 活血祛瘀藥으로 맛과 성질이 辛溫하고 肝胃로 歸經 된다고 하였다[1]. 그 작용이 病所까지 닿아 托毒排膿 및 活血消癰하는 효능을 나타내므로 모든 惡瘡 등에 중요한 약이며, 그 밖에 搜風殺蟲 한다고 알려져 있다[2,3]. 皂角刺에 관한 실험적 접근으로서 이 등[4]이 열수 및 메탄올 추출을 하여 이들 추출물이 抗突然變異 및 抗酸化에 미치는 효과를 硏究 한 바 메탄올 추출물이 突然變異를 억제하는 능력이 우수하였고, 열수 추출물은 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid (비타민 C) 보다 항산화 활성이 높은 것으로 보고하였다. 또한 김[5]은 皂莢과 皂角刺의 기원에 대한 연구를 보고하였으며, Konoshima 등[6]은 皂角刺로부터 gleditsia saponin C 및 gleditsiosied E 등을 분리하였다. 이들 성분에 관한 연구로서 Zhong 등[7] 은 HL-60 세포(human promyelocytic leukemia cells)에서 gleditsiosied E가 세포자연사를 유도하고 G2/M 세포 주기를 억제한다는 사실을 밝혔다. 박[8]은 皂角刺가 抗炎症에 미치는 영향을 평가하고자 炎症의 실험적 · 생화학적 표식자인 cyclooxygenase (COX)를 대상으로 실험하였으며, 결과적으로 皂角刺가 COX의 活性을 강하게 抑制하는 것으로 연구하였다.

한편, 好氣性 생물계에서는 산소를 이용하는 대사 작용이 필연적이며, 대사과정에서 잉여된 산소는 reactive oxygen species (ROS)의 형태로 세포에 각 종 산화적 스트레스를 야기시킨다[9]. 이러한 산화적 스트레스에 기인한 만성심장질환에 비타민 C 및 E, β-carotene등이 미치는 역할에 대한 규명이 보고된 바 있다[10]. 또한 천연항산화 물질이 심혈관계질환을 예방하거나 치료하는 것에 관련된 연구가 진행되어 왔으며[11], 혈관 내피의 기능 저하에 산화적 스트레스가 미치는 영향[12]과 ROS와 hydrogen peroxide

* 교신저자 : 박원환, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2009/03/27 · 수정 : 2009/04/21 · 채택 : 2009/05/14

(H_2O_2)가 심혈관계질환 및 고혈압에서 갖는 역할에 대한 보고가 있다[13,14]. 특히 생체 내 여러 대사경로를 거쳐 유발되는 산화적 스트레스는 세포의 노화와 밀접한 관련이 있고, ROS는 세포의 막을 파괴하거나 혹은 형성 자체의 불능을 일으킨다[9]. 따라서 reactive oxygen species (ROS) 및 reactive nitrogen species (RNS)의 차단은 생체 방어계에서 매우 중요한 수단[15]이므로, 천연물 추출에서 기대할 수 있는 ROS 및 RNS의 소거 活性에 관심이 증가되고 있다. 이러한 관점에서 한약 및 약용식물에서 추출한 복합 물질 및 단일성분은 화학적 합성품에 비하여 부작용이 적어 예방 및 치료, 투약으로서 유용한 가치가 있는 것으로 보여진다[16-20]. 한편, 動脈硬化를 포함한 심혈관계질환의 발병과 진행에 있어 ROS 및 RNS는 유발 위험인자로 보여 지며, 특히 발병 초기에 중심적으로 상관하는 기전으로 밝혀져 있다[10,11].

현재까지 皂角刺는 열수 및 메탄올 추출물에서 抗突然變異 및 일부 抗酸化 효과가 보고된 바 있으나 성분의 계통 분획을 통한 검증이 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 皂角刺 에탄올 추출물 및 유기용매를 이용한 성분 분획 추출물을 대상으로 다양한 抗酸化 活性을 평가하고자 하였다. 또한 動脈硬化의 주요한 진행원으로 알려진 LDL의 산화를 예방하는 효과를 관찰하고자 하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 약재 및 분획추출

본 實驗에 사용한 皂角刺(*GLEDITSIAE SPINA*, GS)는 주엽나무(*Gleditsia japonica* Miquel var. *koraiensis* Nakai)[21]의 가시를 건조한 것으로 2007년산 중국산제품을 (주) 옴니허브(경북, 영천)에서 구입한 후 정선수치하여 사용하였다.

1) GS 70% 에탄올 추출물의 제조

시료 100 g에 2 L의 70% 에탄올을 첨가하여 1차 12 hr, 2차 6 hr, 3차 3 hr 동안 실온에서 교반 추출한 뒤 1 mm-pore-size filter (Whatman No. 2)를 통해 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland)로 감압 농축한 뒤 동결건조하여 시료 2.40g을 얻었다(수율: 2.40%).

2) GS 계통분획물의 제조

70% 에탄올로 추출한 GS는 핵산 : 70% 에탄올 추출물 : 물 (10:9:1, v/v/v)로 분획하여 핵산 추출물을 얻은 후, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물의 순으로 계통 분획하여 감압 농축하였다. 이때의 용매 획분별 수율은 핵산 추출물(hexane, H) 0.17%, 디클로로메탄 추출물(dichloromethane, DCM) 0.23%, 에틸아세테이트 추출물(ethylacetate, EA) 0.67%, 부탄올 추출물(butanol, B) 0.81% 그리고 여액 물 추출물(aqueous residue, A) 0.08%였다. 실험에 사용한 GS의 분획 시료는 실험 전까지 습기가 제거된 초저온 냉동고에 보관하였으며, voucher specimen (08-MRC-055)은 동국대학교 한의과대학 진단학교실에 보관되어 있다.

2. 시약 및 재료

본 硏究에서는 양성대조군(positive control)으로 L-ascorbic acid (vitamin C) 및 butylated hydroxytoluene (BHT)를 사용하였다. 抗酸化活性을 측정하기 위하여 사용한 시약으로 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitro blue tetrazolium (NBT), trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), hypoxanthine, xanthine oxidase, diethylene -triaminepentaacetic acid (DTPA), 4,5-Diaminofluorescein (DAF -2), copper(Ⅱ) sulfate (CuSO4)는 모두 Sigma (SIGMA- ALDRICH Inc., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Human LDL의 과산화억제를 측정하기 위한 human low-density lipoprotein (LDL)은 Calbichem (Merck, Darmstadt, Germany)으로부터 구입하여 實驗에 사용하였다. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) 및 peroxynitrite는 Molecular Probes (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로부터 agarose (LE, analytical grade)는 Promega (Madison, WI, USA)의 제품을 사용하였다. 본 實驗의 plastics은 SARSTEDT (Sarstedt, Inc., Newton, KS, USA) 제품을 사용 하였으며, 기술되지 않은 다른 모든 시약 및 재료는 특급제품을 사용하였다.

3. TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) assay에 의한 항산화효과의 측정

Vitamin E 유도체인 trolox 當量의 抗酸化 능력을 측정하기 위한 방법으로 TEAC를 측정하였다[22,23]. 먼저 GS의 추출물을 최종농도가 1,000 μg/mL이 되도록 희석하고, 희석용액 10 μL를 trolox standard에 ABTS · + 용액 1.0 mL를 첨가하였다. 실온에서 반응시간 1분 후에 UV/Visible spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 6분간 monitoring하였고 1 mM Trolox와 비교하여 흡광도의 저해 %를 구한 후, mM trolox equivalent로 나타내었다.

4. DPPH에 의한 유리기 소거효과의 측정

DPPH는 에탄올에 녹였을 때 유리기의 한 형태로 존재하며, 이에 대한 소거 活性을 측정하기 위한 방법[24]을 일부 수정하여 96-well plate (Franklin Lakes, NJ, USA)에 다음과 같이 적용하였다. 우선 다양한 농도의 GS 추출물을 증류수에 녹이고, 이 중 50 μL를 1 mL의 0.1 mM DPPH-에탄올 용액과 섞었다. 그리고 완충용액으로서 450 μL의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 첨가하여 radical 소거 반응을 일으켰다. 반응은 실온에서 30 분간 진행하였으며 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 최종 흡광도 517 nm에서 검측 하였고, 양성대조군으로 시료와 동일한 농도의 L-ascorbic acid를 처리하여 IC_{50} (inhibition concentration of 50 percent)을 구하였다.

5. NBT assay에 의한 superoxide anion ($O_2 \cdot^-$) 소거효과의 측정

다양한 유기용매를 이용하여 추출한 GS 성분이 superoxide anion을 선별적으로 소거하는 능력을 측정하기 위하여 다음과 같은 방법[25]에 의거하여 實驗을 실시하였다. 먼저 100 μL의 농도별 추출물과 50 mM의 NaOH에 녹인 30 mM hypoxanthine 10

μL 및 30 mM의 EDTA (pH 7.4)를 잘 섞어주고, 1.42 mM NBT 용액을 200 μL 첨가하여 반응 시켰다. 실온에서 3 분 동안 정치시킨 다음 mL 당 0.5 unit으로 용해되어 있는 xanthine oxidase를 100 μL 넣고, 최종 부피를 3 mL가 되도록 50 mM의 phosphate buffer (pH 7.4)를 시험관에 첨가하였다. 반응 유도는 실온에서 20 분간 실시하였으며, microplate reader 를 이용하여 흡광도 560 nm에서 GS 추출물이 superoxide anion의 생성을 소거 하는 정도를 측정하였다.

6. DCFDA assay에 의한 hydroxyl radical (· OH) 소거효과의 측정

GS 추출물의 · OH 제거능을 측정하기 위하여 2′,7′-dichlo-rodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) 측정방법을 사용하여 측정하였다[26]. 지용성 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 탈아세틸화 되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 적정 농도의 시료 10 μL와 menadione 10 μL를 넣고 potassium phosphate buffer (pH 7.4) 130 μL를 넣은 후 · OH를 생성시킨 후, 125 μM DCFDA에 esterase를 넣어 변형된 DCFDH를 50 μL 첨가하여 20 분간 생성된 형광의 변화를 측정하였다. 이 형광의 양을 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm 에서 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

7. DAF-2 assay에 의한 nitric oxide (NO) 소거효과의 측정

활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)의 소거 活性을 검증하기 위한 방법으로 DAF-2 assay를 이용하였다[27]. GS 추출물의 특이적인 NO의 indicator인 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여 490-495 nm의 파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO양에 의존한다. 1 mg의 DAF-2를 550 μL의 DMSO에 녹인 후, 이것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1 : 400배로 희석하였다. NO 제공물질인 SIN-1과 DAF-2를 96 well plate에 첨가하였으며, DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 excitation wave length 485 nm 및 emission wave length 530 nm에서 fluorescence microplate reader를 이용하여 측정하였다.

8. DHR 123 assay에 의한 peroxynitrite($ONOO^-$) 소거효과의 측정

GS 추출물의 peroxynitrite 소거 효과 측정을 위해 96-well microplate에 GS 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 형광광도계를 이용하여 excitation 500 nm, emission 536 nm에서 측정하였다. $ONOO^-$ 생성원으로는 시판되는 peroxynitrite 를 직접 사용하거나 SIN-1에 의해 생성되는 superoxide anion과 nitric oxide의 반응으로 발생하는 $ONOO^-$의 제거 活性을 검토하였다[28].

9. Cu^{2+}로 유도된 human LDL의 산화 억제효과의 측정

구리(Cu^{2+}) 이온으로 유도된 human LDL의 산화 경로를 억제하는 GS 추출물의 抗酸化 活性을 검증하기 위한 방법으로 다음의 두 가지 실험을 진행하였다.

1) TBARS assay

GS 추출물이 사람의 LDL 산화를 억제하는 효과를 검증하기 위하여 먼저 최종 농도가 100 μg/mL가 되도록 human LDL을 10 mM phosphate buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4)에 희석하였다. 그리고 다양한 농도로 준비된 GS 추출물 100 μL를 시험관에 넣고 500 μL의 LDL을 첨가하였다. 산화를 유도하기 위한 첨가제로서 0.1 mM CuSO4를 넣고 10 mM PBS를 완충용액으로 시험관 내 반응액의 최종 부피가 3 mL가 되도록 조정하였다. 혼합 용액의 산화 반응을 유도하기 위한 과정으로서 30분 동안 37℃에서 정치하였으며, 이 때 생성된 지질 과산화의 생성물인 malondialdehyde (MDA)의 양을 측정하기 위하여 1.5 mL의 20% TCA 및 0.05 M NaOH에 녹인 동량의 0.67% TBA를 첨가한 후 90℃의 온도에서 50분 동안 가열 하였다. 반응액은 다시 얼음에서 냉각 시킨 후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였고 최종 상등액을 microplate reader 를 이용하여 532 nm에서 측정하였다[29]. 결과는 대조군 活性 대비 IC_{50}으로 구하였다.

2) Relative electrophoretic mobility (REM) assay of LDL

산화된 LDL의 전기적 이동 특성을 이용한 REM assay는 agarose gel 상에서 측정이 가능하며 이는 다음과 같은 방법으로 실시되었다[30]. 먼저 10 mM PBS에 희석된 120 μg/mL의 LDL 80 μL를 1.5 mL 용량의 micro centrifuge tube에 분주하고, 10 μL의 농도별 GS 추출물 및 산화 유도제로서 최종 농도 10 μM이 되도록 $CuSO_4$를 첨가하여 잘 섞어 준 후 혼합 용액을 37℃ water bath에서 12 시간 동안 반응 시킨 후 0.7% agarose gel에서 전기영동 하였다. Agarose gel은 실온에서 1 시간의 건조 과정을 거치고, 교반기 상에서 coomassie brilliant blue R-250로 염색하였으며 다시 탈색과정을 마친 후 실온에서 완전건조 되기까지 방치하였다.

10. Total phenolics의 측정

GS 70% 에탄올 추출물 및 용매별 분획의 total phenolics 함량은 Folin-Ciocalteus 반응에 의해 실시하였으며, 측정 표준품으로 gallic acid를 사용하였다. 먼저 200 μL의 Folin-Ciocalteus reagent와 1160 μL의 증류수가 혼합된 용액에 40 μL의 GS 추출물 (1 mg/mL)을 첨가하여 3 분간 실온에서 반응시켰다. 그리고 600 μL의 20% sodium carbonate와 혼합하여 다시 실온에서 2 시간 동안 교반한 후, microplate reader를 이용하여 흡광도 765 nm에서 total phenolices의 함량을 측정하였다. 결과는 gallic acid equivalents (μg of GA eq/mg)로 나타내었다.

11. 통계 처리

통계 분석은 SPSS version 14.0 for Windows (SPSS,

Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 실험군 결과의 평균과 표준편차를 구하여 one-way ANOVA로 분석하였다. 결과는 $p<0.05$에 한하여 유의성이 있는 것으로 인정하였으며, Tukey test를 이용하여 이를 검정하였다.

결 과

1. GS의 항산화효과 및 유리기 소거효과

ABTS 양이온 radical의 흡광도가 GS 추출물에 의하여 소거되는 정도를 평가한 결과 먼저 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid 및 BHT는 각각 0.223±0.033 및 0.822±0.017 (IC_{50}=μg/mL)로 trolox 當量 매우 우수한 소거 活性을 나타내었다(Table 1). GS 에탄올 추출물 및 이들의 유기용매 분획은 낮은 活性이 보여 졌으나 분획 상호간 비교하였을 때 E층 및 EA 분획이 0.048으로 가장 높은 소거 活性을 나타내었다. DPPH radical의 소거 효과를 측정하였을 때 GS 추출물은 radical의 불안정 상태를 환원하는 것으로 측정 되었으며, 특히 EA 분획은 396.46±12.54로서 분획 상호간 비교에서 가장 낮은 IC_{50} (μg/mL) 값을 나타냈다.

Table 1. Antioxidant activities of the extract of GS and its fractions as determined by the TEAC and DPPH assay.

GS ethanol extract and its fraction[a]	TEAC[b] (mM Trolox equivalent)	DPPH[b] (IC_{50}=μg/mL)
E	0.048±0.002	988.76±29.09
H	0.013±0.001	NA[c]
DCM	0.031±0.002	996.61±37.90
EA	0.048±0.003	396.46±12.54
B	0.041±0.002	1549.29±25.78
A	0.012±0.001	1417.71±32.36
AA	0.223±0.033	115.31±9.64
BHT	0.822±0.017	160.51±10.12

a : E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethylacetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous residue; AA, ascorbic acid and BHT, butylated hydroxytoluene. b : Each values represent the means ± S.D of triplicate experiments. c : NA is not active.

2. ROS 및 RNS의 소거 효과

GS 추출물이 superoxide anion을 소거하는 活性을 살펴본 결과 추출물 처리 농도에 의존하는 소거를 나타내었으며(data is not shown), xanthine oxidase와 hypoxanthine 사이에서 일어나는 반응을 통한 superoxide radical의 생성을 다음과 같이 강력하게 억제 시켰다. 먼저 GS 에탄올 추출물은 IC_{50} (μg/mL)을 기준하였을 때 4941.82±26.13으로 측정 되었으며, EA의 경우 2425.31±12.24로 GS 추출 및 분획 중 가장 낮은 값을 나타내었다. 다음으로 ROS의 generation 반응 중 가장 강력한 활성 산소로 알려진 hydroxyl radical을 제어 하는 GS 추출물의 活性을 평가하였을 때 에탄올 추출물에서 IC_{50} (μg/mL)이 1272.45±23.27으로 나타났다. GS 에탄올 추출과 분획 추출 상호간 비교 하였을 때 평균적으로 분획의 경우가 hydroxyl radical을 더 높게 소거하는 것을 알 수 있었으며, 양성대조군을 제외한 실험군 중 EA가 가장 강력한 소거능 (IC_{50} = 261.69±13.56 μg/mL)을 보였다. H 및 DCM에서는 소거 活性이 관찰되지 않았고 다른 분획은 소거 활성이 미약하였다(Table 2). GS 추출물의 NO 소거 活性을 평가하였을 때 EA 분획 (8.01±0.22)이 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid (8.34±1.10) 보다 우수한 IC_{50} (μg/mL) 값을 나타내었다. GS 에탄올 및 다른 분획에서는 EA에 비하여 우수한 효과를 관찰할 수가 없었다(Table 2). 한편 Superoxide anion과 NO의 제한적 반응에 의해 생성되는 peroxynitrite ($ONOO^-$)는 GS 에탄올 추출물 및 분획에 의하여 다음과 같이 소거 活性을 나타내었다. 우선 GS 에탄올 추출물은 40.11±8.22의 IC_{50} (μg/mL)을 보였으며, DCM과 EA 분획이 각각 9.77±1.10 및 8.62±1.19로서 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid (5.92±0.04)와 비교하였을 때 유사한 활성이 있는 것으로 평가 되었다(Table 2).

Table 2. Reactive oxygen and nitrogen species scavenging activities of GS ethanol extract and its fraction.

GS ethanol extract and its fraction[a]	Superoxide[b] (IC_{50}=μg/mL)	Hydroxyl radical[b]	NO[b]	$ONOO^-$[b]
E	4941.82±26.13	1272.45±23.27	40.79±1.20	40.11±8.22
H	NA[c]	NA[c]	187.55±8.29	57.87±13.93
DCM	3723.68±28.00	NA[c]	58.16±2.25	9.77±1.10
EA	2425.31±12.24	261.69±13.56	8.01±0.22	8.62±1.19
B	3978.61±25.49	327.64±18.37	24.72±1.42	65.60±8.29
A	6888.69±19.87	923.68±15.45	60.36±1.59	63.86±10.24
AA	1041.18±20.24	61.79±2.96	8.34±1.10	5.92±0.04
BHT	NA[c]	NA[c]	NA[c]	121.84±18.90

a : E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethylacetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous residue; AA, ascorbic acid and BHT, butylated hydroxytoluene. b : Each values represent the means ± S.D of triplicate experiments. c : NA is not active.

3. Human LDL의 산화 억제 효과

다양한 농도의 GS 추출물을 처리 하였을 때 분획 추출에 따른 LDL의 산화 억제 반응을 TBARS 및 REM 법으로 측정하였다. 먼저 시험관 측정법인 TBARS assay를 통한 LDL의 산화 억제를 측정하였을 때 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid는 6.18±1.24 μg/mL의 IC_{50}을 나타내었으며, GS 추출물 중 EA 분획 (11.20±1.24)이 유사한 소거 활성을 보였다(Table 3). 산화된 LDL의 전기적 이동성을 이용한 REM 실험의 결과에서는 GS 에탄올 추출물 및 DCM, EA 분획에서 $CuSO_4$로 유도된 LDL의 산화적 손상을 억제하였으며, 특히 최종 처리 농도 10 μg/mL에서 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 보다 우수한 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1).

Table 3. Inhibitory effect on Cu^{2+}-induced LDL oxidation of GS ethanol extract and its fraction.

GS ethanol extract and its fraction[a]	LDL oxidation[b] (IC_{50}=μg/mL)
E	27.83±2.13
H	383.42±15.45
DCM	54.65±8.00
EA	11.20±1.24
B	51.11±5.49
A	61.24±9.87
AA	6.18±1.24
BHT	2.63±0.24

a : E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethylacetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous residue; AA, ascorbic acid and BHT, butylated hydroxytoluene. b : Each values represent the means ± S.D of triplicate experiments.

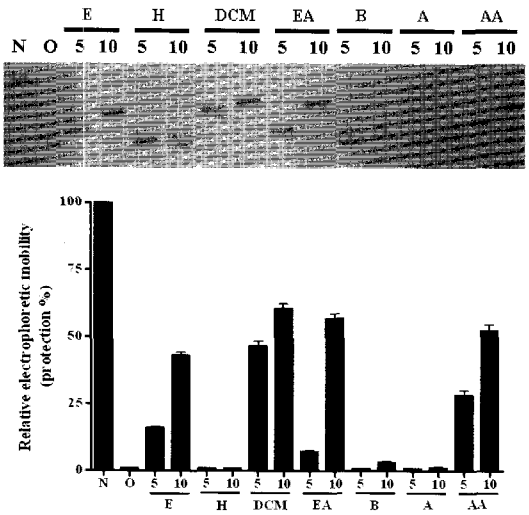

Fig. 1. Effects of GS ethanol extract and its fraction on relative electrophoretic mobility of LDL. Huma LDL (120 μgprotein/mL) was added to GS extract, its fraction and reference antioxidant including ascorbic acid. The LDL oxidation was initiated by adding 10 μM $CuSO_4$. After incubation for 12 h at 37℃, then oxidative LDL was loaded on 0.7% agarose gel for 60 min. N, native LDL; O, oxidative LDL; E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethylacetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous residue and AA, ascorbic acid.

4. Total phenolics 함량

GS 에탄올 및 분획의 total phenolics 함량을 측정한 결과 GS 에탄올 추출물은 133.18±5.40 μg of GA eq/mg의 phenolics 함량을 나타내었다. 가장 많은 함량을 나타낸 DCM은 184.89±8.71로 측정이 되었고, 다음으로 EA가 170.83±4.44로 total phenolics 함량이 높게 평가되었다(Table 4).

Table 4. Contents of total phenolics of GS and its fraction.

GS ethanol extract and its fraction[a]	Total phenolics[b] (μg of GA[c] eq/mg)
E	133.18±5.40
H	14.53±1.33
DCM	184.89±8.71
EA	170.83±4.44
B	76.97±6.71
A	67.97±7.87

a : E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethylacetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous residue. b : Each values represent the means ± S.D of triplicate experiments. c : GA, gallic acid

고 찰

최근까지의 실험적 報告에서 皂角刺는 抗炎症 및 抗酸化에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며[4,8], 皂角刺 나무의 열매를 추출하여 각 종 암세포에서 성장억제[31] 및 HepG2 세포에서 VEGF mRNA 발현을 저해 하는 것으로 보고된 바 있다[32]. 金[33]등은 皂角刺를 기타 항암제로 구분하여 기록 하였으며, 托毒排膿, 活血消癰 및 搜風殺蟲 하는 효능을 나타낸다고 하였다[2,3]. 하지만 이러한 자료에 근거한 효능 및 현대적 實驗에도 불구하고 皂角刺 의 계통분획을 통한 다양한 抗酸化 효과에 대한 연구가 미흡하였다.

생명체가 성장 및 발육하며 동시에 성숙과 쇠퇴의 과정을 거치는 일련의 생물학적 진행에서 있어서 행태 저하와 기능적 퇴화가 일어나는 것을 老化라고 정의 되며 노화의 과정에 있어 好氣性 呼吸은 매우 중요한 환경적 요인으로 작용한다[34]. 呼吸의 잉여 대사산물은 reactive oxygen species (ROS) 및 reactive nitrogen species (RNS)와 같은 유리기의 형태로 전환되며, 생성된 radicals은 각종 산화적 스트레스와 연관이 있다[9]. 따라서 이러한 ROS 및 RNS를 소거하려는 노력은 보편화 되어 있으며, 특히 韓藥과 같은 천연물에서 이를 억제하고자 하는 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 한편, 呼吸 이외에 생체 내 유리기 생성은 지나친 紫外線 노출과 吸煙 등 다양한 원인이 보고되고 있다[35]. 일반적으로 생체 내에서 유해하다고 알려진 radicals의 종류로는 superoxide radical ($O_2^-\cdot$) 및 hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등이 있으며, 이들은 세포의 구성 성분인 불포화 지방산을 과산화 시키거나 세포 내 거대 분자들의 산화적 손상을 일으킨다[36]. 이러한 radicals을 억제하기 위한 대표적인 시험관적 실험법 (*in vitro*)으로 TEAC 값의 측정 및 DPPH radical의 소거를 들 수 있다. TEAC는 수용성 vitamin E의 수용체인 trolox의 ABTS 양이온 radical (ABTS+·)을 소거하는 능력과 비교하여 抗酸化 活性을 측정하는 방법으로 혈장이나 혈청을 포함한 radical 소거능 측정 방법에 있어 광범위하게 응용된다[22,23]. DPPH는 불균형하게 이루어진 구조를 가졌으며 에탄올에 녹였을 때 violet 색깔을 보이다가 환원형으로 radical이 소거되면 투명하게 되는 원리를 이용한다[37]. 이러한 원리를 근거하여 GS 70% 에탄올 추출물 및 분획이 ABTS 양이온 radical을 소거하는 活性을 평가한 결과 EA 분획이 trolox 當量 소거 活性이 높았으며, DPPH radical의 소거 活性 또한 EA가 IC_{50} (μg/mL)에 있어 분획 상호간 비교에서 비교 우위적 저해효과 (396.46±12.54)를 나타내었다(Table 1). 또한 잉여된 생체 내의 산소가 Fenton's reaction 및 Haber-Weiss 반응을 통해 여러 형태의 활성산소종을 생성시키는데 이 중 가장 초기에 유도되는 superoxide anion은[38] GS 추출물 및 계통분획에서 저해 활성이 관찰되었다. 따라서 GS 추출물은 초기 ROS 생성 경로를 차단하는 것으로 보여지며, 특히 EA는 IC_{50} (μg/mL)이 2425.31±12.24으로서 superoxide anion이 보다 강력한 radical의 형태로 전환되는 것을 방지하는 것으로 기대된다. Hydroxyl raical은 보다 강력한 형태의 불안정화 된 radical로서 rheumatoid arthritis, atherosclerosis, skin aging, diabetes 및 carcinogenesis 등을 포함한 병변의 발생과도 관련이 있는 것으로 보고되어 있다[39,40]. Hydroxyl radical을 소거 하는 GS 추출물의 효과는 E에서 IC_{50} (μg/mL) 값이 1272.45±23.27으로 측정 되었으며, 다른 radical의 소거 活性과 유사한 형태로 EA가 가장 낮은 261.69±13.56으로 효과가 뛰어났다(Table 2).

대표적인 RNS로서 nitric oxide (NO) 및 peroxynitrite ($ONOO^-$)는 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 강력한 산화 유발 물질로 구분되어 있으며, 생체의 다양한 질병을 야기 한다[41,42]. $ONOO^-$는 생체 내에서 superoxide와 NO의 제한된 반응에 의해 생성되며, 이들의 농도에 의존한다. 본 연구에서 NO의 소거 活性을 확인한 결과에서는 GS EA 분획이 ascorbic acid보다 낮은 IC_{50}값 (8.01±0.22 μg/mL)을 나타내었으며, GS 추출물에 의한 $ONOO^-$의

생성 저해 및 소거를 평가한 결과, E 및 DCM, EA에서 모두 $ONOO^-$에 대한 소거 활성이 강력한 것으로 나타났다. $ONOO^-$ 소거 측정 실험에서도 ROS에서와 마찬가지로 EA는 단연 우수한 효과를 나타내었으며, IC_{50} (μg/mL) 값은 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid와 유사하였다(Table 2). 이는 생체에서 GS 추출물이 염증반응 및 면역체계 이상에 매우 의미 있을 것으로 보인다.

한편, 動脈硬化를 포함한 심혈관계관련 질환에의 초기 단계에서 발견되는 oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL)의 형성은 LDL이 산화 되어 발생하며, 혈관내피 및 평활근세포에 지나친 자극을 주게 된다. 또한 Ox-LDL은 혈관 내 지질의 변성과 動脈硬化의 진행을 촉진 하는 것으로 알려져 있다[43]. 따라서 LDL의 산화를 억제하거나 산화된 LDL의 혈관 내 자극반응으로 전개하는 것을 차단하는 일은 병변의 예방 및 치료에 유효한 것으로 보여 지며, GS 추출물은 $CuSO_4$로 유도시킨 LDL의 산화를 시험관 측정법을 이용한 TBARS에서 EA는 강력한 산화 억제를 나타내었다(Table 3). 또한 산화된 LDL의 전기적 이동성을 이용한 REM assay에서 GS의 DCM, EA 및 B에서 우수한 천연물 유래의 LDL 산화 억제를 나타내는 것으로 평가 되었다(Fig. 1).

Phenolic compounds는 일반적으로 식물에서 발견되며, 抗酸化 活性을 포함한 다양한 生物學的 효과를 가지는 것으로 보고되었다[44,45]. Folin-Ciocalteus 방법에 의한 GS 에탄올 추출물 및 분획의 total phenolics의 함량을 측정하였을 때 DCM 및 EA에서 각각 184.89±8.71, 170.83±4.44 μg of GA eq/mg으로 높은 phenolic compounds가 검출 되었다(Table 4). 특히 EA는 DCM보다는 적은 양의 total phenolics을 함유 하는 것으로 측정되었으나, 오히려 抗酸化 活性 및 LDL의 산화를 억제하는 효과는 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 GS의 EA가 함유한 total phenolics 성분이 DCM의 total phenolic 성분 보다 생리적 活性이 우수할 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과를 종합하였을 때 GS 추출물은 ROS 및 RNS의 generation을 차단하거나 생성된 radicals들을 소거 하는데 매우 유용하며, 동맥경화의 초기 단계에서 LDL의 산화를 통한 병변의 진행을 막을 수 있다고 보여 진다. 특히 EA 분획에 함유 되어 있는 생리 활성 물질에 대한 관심과 EA의 구성 성분(특히 phenolic compounds)에 대한 심도 있는 연구가 더욱 필요할 것으로 사료 된다.

결 론

活血祛瘀藥으로 托毒排膿 및 活血消癰하는 효능을 나타내는 皂角刺(*GLEDITSIAE SPINA*, GS)를 에탄올 추출하고 다양한 유기용매로 성분 분획하여 이들이 갖는 抗酸化 活性을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 먼저 TEAC법으로 검증한 GS 추출물의 抗酸化 活性은 양성대조군인 ascorbic acid 보다 낮았으며, 추출물 상호간의 비교에서 GS 에탄올 추출물과 EA가 가장 우수한 것으로 나타났다. 또한 DPPH radical 소거에서는 IC_{50}값이 GS추출물 및 그 분획물이 전반적으로 ascorbic acid에 비하여 높게 나타났으나, 분획 상호간의 비교에서는 EA에서 가장 소거 활성이 높게 나타났다. Superoxide anion 및 hydroxyl radical을 소거하는 GS 추출물의 活性을 살펴본 결과 EA 분획에서 강한 소거능이 관찰 되었다. 그리고 RNS의 저해를 측정하였을 때 EA층이 peroxynitrite 및 nitric oxide를 매우 강하게 소거하였으며, 이는 양성대조군인 ascorbic acid와 유사하거나 낮은 IC_{50} 값을 보였다. TBARS법에 의한 시험관 내 LDL oxidation 억제 실험에서 H를 제외한 GS 및 모든 분획물에서 저해 活性을 보였으며, 특히 EA는 천연물로서 매우 강한 oxidation 저해를 나타내었다. REM assay를 통한 GS 추출물의 LDL 산화 저해 정도를 평가하였을 때 E 및 DCM 그리고 EA에서 모두 강한 억제 효과를 나타내었으며, 10 μg/mL에서는 ascorbic acid과 유사하거나 우수한 저해를 보였다. GS 에탄올 추출물 및 분획의 total phenolics 함량을 측정한 결과에서는 DCM 및 EA에서 높은 phenolic compounds를 함유하는 것으로 나타내었다.

이상의 결과에서 GS 에탄올 추출물 및 그 분획물은 천연물 추출물로서 우수한 抗酸化 活性을 보이는 것으로 판단되며, 특히 다양한 유기용매 추출에서 각 분획에 의존한 결과를 도출함으로서, 향후 EA 분획에서 유용한 천연물 유래의 단일물질 성분의 개발이 기대된다. 또한 이러한 抗酸化 및 LDL 산화 억제 반응을 통하여 심혈관계 질환의 예방 및 치료 경로에서의 활용성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비 및 과학기술부/한국연구재단 기초의과학연구센터 육성사업 (과제번호 : R13-2005-013-01001-0)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 정보섭, 신민교. 圖解鄕藥大事典. 서울, 永林社, pp 680-682, 1998.
2. 육창수, 김성만, 정진모, 정명숙, 김정화, 김승배. 韓藥의 藥理 · 成分 · 臨床応用. 서울, 癸丑文化社, p 880, 1982.
3. 한방약리학교재편찬위원회. 한방약리학. 서울, 신일상사, pp 754-756, 2005.
4. 이신규, 신정인, 서운교, 정지천. 皂角刺의 抗突然變異 및 抗酸化 活性에 관한 硏究. 대한한방내과학회지 22(2):215-222, 2001.
5. 金仁洛. 皂莢과 皂角刺의 기원에 대한 연구. 대한본초학회지 21(1):44-49, 2006.
6. Konoshima, T., Yasuda, I., Kashiwada, Y., Cosentino, L.M., Lee, K.H. Anti-AIDS agent, 21 Triterpenoid saponins as anti-HIV principles from Gleditsia japonica and Gymnocladus chinensis and a structure-activity correlation. J. Nat. Prod. 58: 1372-1377, 1995.
7. Zhong, L., Qu, G., Li, P., Han, J., Guo, D. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by Gleditsioside E

from Gleditsia sinensis in HL-60 cells. Plant Med. 69: 561-563, 2003.

8. 박용기. 皂角刺의 消炎作用에 대한 實驗的 硏究. 東國大學校 大學院博士學位論文, 1995.
9. Yagi, K. Lipid peroxides and human disease. Chem. Phys. Lipids. 45: 337-351, 1987.
10. Diane, L.T. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: Emphasis on vitamin C, vitamin E, and β -carotene. Circulation. 99: 591-595, 1999.
11. Hur, E.S., Lee, K.H. Cardiovascular disease and natural antioxidants. J. Human Ecology. 5: 19-35, 2001.
12. Cai, H., Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ. Res. 87: 840-844, 2000.
13. Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol. 122: 339-352, 2004.
14. Cai, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. Cardiovascular Res. 68: 26-36, 2005.
15. Barnen, A.L. Toxicological and biochemistry of BHA, BHT. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 59-64, 1975.
16. Bishov, S.J., Masuoka, Y., Kapsalis, J.G. Antioxidant effect of spices herbs and hydrolyzates in freeze dried model system synergistic action with synthtic antioxidants. J. Food Proc. Preserv. 1: 153-159, 1977.
17. Kim, Y.J., Kim, C.K., Kwon, Y.J. Isolation of antioxidative components of Perillae semen. Kor. J. Food Sci. Technol. 29: 38-44, 1997.
18. Fukuda, Y., Osawa, T., Kawagishi, S., Namiki, H. Oxdative stability of foods fried with sesame oil. NSKG. 38: 28-30, 1988.
19. Lee, J.C., Kim, H.R., Kim, J., Jang, Y.S. Antioxidant property of ethanol extract of the stem of Opuntia ficus-indica var. Saboten. J. Agric. Food Chem. 50: 6490-6496, 2002.
20. Wei, Z., Bai, O., Richardson, J.S., Mousseau, D.D., Li, X.M. Olanzapine protects PC12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. J. Neuro. Res. 73: 364-368, 2003.
21. 홍남두, 김남재. 한약의 품질관리. 서울, 신일상사, pp 475-476, 2004.
22. 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 Biology & Medicine. 26: 1231-1237, 1999.
23. 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.
24. Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. Gen. Pharmacol. 32: 661-667, 1999.
25. Gotoh, N., 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.
26. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview. Method Enzymol. 186: 1-85, 1990.
27. Crow, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. Nitric Oxide. 1: 145-157, 1997.
28. Sutherland, H., Khundkar, R., Zolle, O., McArdle, A., Simpson, A.W., Jarvis, J.C., Salmons, S. A fluorescence-based method for measuring nitric oxide in extracts of skeletal muscle. Nitric Oxide. 5: 475-481, 2001.
29. Xu, M.Z., Lee, W.S., Han, J.M., Oh, H.W., Park, D.S., Tian, G.R., Jeong, R.S., Park, H.Y. Antioxidant and anti-inflammatory activities of N-acetyldopamine dimers from Periostracum cicadae. Bioorg. Med. Chem. 14: 7826-7834, 2006.
30. Hu, C., Zhang, Y., Kitts, D.D. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo Phyllostachys nigra var. Henonis leat extract in virto. J. Agric. Food Chem. 48: 3170-3146, 2000.
31. Chui, C.H., Tang, J.C., Lau, F.Y., Teo, I.T., Yau, M.Y., Wong, R.S., Cheng, G.Y., Ho, S.K., Leung, T.W., Hui, K.S., Wong, M.M., Fatima, S., Cheng, C.H., Cheng, F., Tan, W.Q., Chow, L.M., Guo, D., Chan, A.S. Gleditsia sinensis fruit extract induced growth inhibition involves basic fibroblast growth factor and nitric oxide. Int. J. Mol. Med. 13: 169-173, 2004.
32. Chow, L.M., Chui, C.H., Tang, J.C., Teo, I.T., Lau, F.Y., Cheng, G.Y., Wong, R.S., Laung, T.W., Lai, K.B., Yau, M.Y., Gou, D., Chan, A.S. Gleditsia sinensis fruit extract is a potential chemotherapeutic agent in chronic and acute myelogenous leukemia. Oncol. Rep. 10: 1601-1607, 2003.
33. 김형균, 김형민, 송봉근, 이언정, 정헌택. 韓藥의 藥理. 서울, 고려의학, p 411, 2000.
34. 沈吉浩. 老化의 槪念과 豫防. 서울, 成文出版社, pp 15-17, 1987.
35. Ames, B.N., Cahcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. Hypothesis Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 6858-6862, 1981.

36. Aruoma, O.I., Kaur, H., Halliwell, B. Oxygen free radicals and human disease. J. Roy. Soc. Health. 111: 172-177, 1991.
37. Philip, M. The use of the stable free radical diphenylricrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26: 211-219, 2004.
38. Giles, G.I., Tasker, K.M., Jacob, C. Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine. 31: 1279-1283, 2001.
39. Cerutti, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. Eur. J. Clin. Invest. 21: 1-11, 1991.
40. Stadtman, E.R., Oliver, C.N. Metal ion-catalyzed oxidation of protein, physiological consequences. J. Biol. Chem. 266: 2005-2008, 1991.
41. Virág, L., Szabó, E., Gergely, P., Szabó, C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: metabolism and opportunities for intervention. Toxocol. Lett. 11: 140-141, 2003.
42. Channon, K.M., Qian, H., George, S.E. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20: 1873-1881, 2000.
43. Madamanchi, N.R., Hakim, Z.S., Runge, M.S. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. Thrombosis and Haemostasis. 3: 254-267, 2004.
44. Sato, M., Ramarathnam, N., Suzki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M., Ochi, H. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. J. Agric. Food Chem. 44: 37-41, 1996.
45. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Bio. Med. 20: 933-956, 1996.