

夜交藤이 흰쥐 뇌와 간에서의 산화 억제에 미치는 영향

이한구, 한효상, 이영종*

경원대학교 한의과대학 본초학교실

The Study of the Anti-oxidative Effects of Polygonati Multiflori Caulis on Oxidized Brain and Liver Cells in Rats

Han-Goo Lee, Hyo-Sang Han, Young-Jong Lee*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

ABSTRACTS

Objectives : This study was purposed to the anti-oxidative effects of Polygonati Multiflori Caulis(henceforth PMC) on oxidized brain and liver cells in rats.

Methods : After extraction of PMC with water, the water extract was divided into five fractions : hexane, ethyl ether, ethyl acetate, butanol and an aqueous fraction. The phenol contents of each fraction were measured. The lipid peroxidation inhibition effect were then investigated.

Results : After processing PCM water and PCM fractionations on oxidized brain cells in rats, the SOD (super oxide dismutase) activity and glutathione content were increased, and the NO (nitric oxide) content was decreased. It had much higher SOD activity than liver cells in rats excluded in the *n*-BuOH and aqueous fractions. In case of oxidized liver cells in rats, the SOD activity and glutathione content increased, while both the NO content and the MDA (malondialdehyde) content decreased. It had much higher glutathione content than brain cells in rats in the every fractions. It had much lower MDA content than brain cells in rats in the Aqueous fractions and brain cells in rats had much lower MDA content than liver cells in rats in the total extract, *n*-hexane, EtOEt, EtOAc and *n*-BuOH fractions.

Conclusions : PMC has anti-oxidative effect on oxidized liver cells and brain cells in rats, through there are differences in fraction. Additionally, Anti-oxidative effect of brain cells can be relaxed the mental nerve and it is related PMC effect.

Key words : Polygonati Multiflori Caulis, anti-oxidative effect

서론

夜交藤은 마디풀과(Polygonaceae)에 속한 다년생 덩굴 식물인 하수오 *Polygonum multiflorum* Thunb.의 蔓莖을 건조한 것으로, 여름과 가을에 채취한다¹⁾.

夜交藤의 명칭은 《本經逢原》²⁾에 何首烏의 異名으로 처음 기록 되었으며, 《本草綱目》³⁾에 “何首烏 莖葉 風瘡 疥癬 作痒 煎湯洗浴甚效”라고 기재된 이후, 임상에서 養

心安神, 祛風, 通絡의 효능이 있어 失眠, 多夢, 血虛身痛, 風濕痺痛, 皮膚瘙癢症, 瘡腫, 疥癬, 癩癧 등을 치료 한다⁴⁾.

夜交藤의 기원은 《中華人民共和國藥典》⁵⁾에 首烏藤이란 명칭으로 하수오 *Polygonum multiflorum* Thunb.의 藤莖을 건조한 것으로, 藤莖만을 지칭하였으나, 《中華本草》⁴⁾에서는 줄기뿐만 아니라 잎을 같이 지칭하여 수재되어 있다. 또한 채취시기에 따라 여름과 가을에는 줄기와 잎을 같이 채취하고, 가을과 겨울에는 주로 줄기만

* 교신저자 : 이영종, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 031-750-5415 · E-mail : garak@kyungwon.ac.kr
· 접수 : 2010년 2월 11일 · 수정 : 2010년 3월 22일 · 채택 : 2010년 3월 22일

을 채취하여 건조하는 것으로 혼재되어 사용되고 있다³⁾.

하수오 식물의 성분에는 뿌리줄기에는 chrysophanol, emodin, rhein, chrysophanol anthrone⁴⁾이, 줄기에는 emodin, physcion, β -sitosterol, anthraglycoside, polygoacetophenoxide 등이 함유되어 있다⁶⁾. 최근 밝혀진 하수오 뿌리줄기의 약리 작용으로 뇌혈류 개선효과⁷⁾, 항산화효과⁸⁾, 뇌신경의 퇴행성 변화 방지효과⁹⁾, 동맥경화 방지효과¹⁰⁾ 등이 밝혀지고 있고, 하수오 줄기의 효능으로는 진정최면작용³⁾,抗癌작용¹¹⁾이 있다.

인체 내에서 다양한 경로에 의하여 유발되는 산화적 스트레스는 생체 안에 존재하는 항산화계에 의해 제거되지만 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 생체막의 손상, 고분자 단백질 및 DNA의 변형과 기능상실 등으로 인한 다양한 퇴행성 질환이 유발될 수 있다¹²⁾.

이에 저자는 하수오의 뿌리줄기에서는 항산화효과가 보고되었는데, 줄기에서는 항암효과는 보고되었으나 항산화효과가 보고되지 않았으므로, 夜交藤(《중화인민공화국약전》에 근거하여 잎을 제거한 것)이 항산화 효과와 관련이 있을 것으로 생각되어, 산화 쥐의 뇌 및 간세포에서의 항산화 효과를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 동물

동물은 6주령의 수컷으로 Sprague-Dawley Rat을 (주)대한 바이오링크로부터 공급받아 실험당일까지 고형사료(抗生劑 無添加, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2°C를 유지하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해서 *n*-hexane (Samchun Chemical, Korea), *n*-butanol (Samchun Chemical, Korea), Ethyl ether (Samchun Chemical, Korea), Ethyl acetate (Samchun Chemical, Korea), AAPH (Wako, Japan), D-PBS (Sigma, USA), RPMI 1640 media (Sigma, USA), Anti-biotoxs (Sigma, USA), FBS (Logan, USA), SOD assay kit (Dojindo, Japan), Glutathione kit (Dojindo, Japan), NO assay kit (Oxford, USA), Lipid peroxidation assay kit (Oxford, USA), Catalase assay kit (Oxford, USA) 등이 사용 되었다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 Pulverizer (Rong tsong,

Taiwan), Rotary evaporator (Eyela, Japan), Air compressor (Tamiya, Japan), Homogenizer (Omni, USA), Centrifuge (Hanil, Korea), Research microscope (Leica, USA), Fume hood (Hanil, Korea), Clean bench (Jeio tech, Korea), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Vortex mixer (Vision Scientific Co, Korea), Water bath (iNTRON biotech, Korea), Plate shaker (Lab-Line, USA), Ice-maker (Vision Scientific Co, Korea) 등이다.

3) 약재

본 실험에 사용된 夜交藤(Polygonati Multiflori Caulis, 이하 PMC)은 2005년 6월, 경원대학교 본초실습원의 재배품을 채취하여 그늘에 말려 사용하였으며, 약재는 초음파세척기를 이용해 불순물을 씻어낸 뒤, 건조 후 사용하였다.

2. 방법

1) 약물

(1) 전탕 추출

夜交藤을 가루로 하고 약 100 g을 취하여 1 l의 증류수를 넣고 약탕기(웅진약탕기, 한국)를 이용하여 3시간 동안 끓였다. 夜交藤 추출액을 여과지에 걸러 감압농축한 후, 동결 건조하여 夜交藤(PMC) 건조 추출물 23.3g (23.3%)를 얻었다.

(2) 분획 추출

夜交藤 전탕에서 얻은 건조추출물을 20g에 증류수 400 ml를 넣어 녹인 후, 분획여두를 이용하여 *n*-hexane, ethyl ether (이하 EtOEt), ethyl acetate (이하 EtOAc), *n*-butanol (이하 *n*-BuOH) 및 증류수로 극성에 따라 분획하여 얻은 각각의 물 전탕 추출물을 각 층별로 모아 감압농축한 후 동결 건조하여 각 분획의 건조 추출물 얻었다. 각 분획별로 9%, 1.7%, 2.5%, 14.5%, 24%의 건조추출물을 얻었다(Fig. 1).

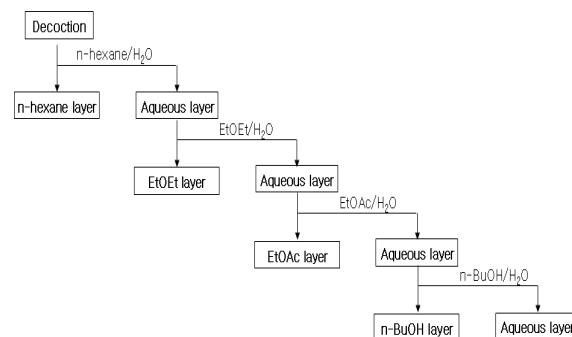


Fig. 1. Procedure of various solvent fractions from decoction extract of Polygonati Multiflori Caulis

2) 세포 생존율 측정

(1) 세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령 수컷의 SD rat의 간 조직을 사용하였다. EtOEt를 이용하여 실험동물을 마취시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS (Ca^{2+} , Mg^{2+} free)를 투여하며 복부의 대동맥을 절단하여 동물의 혈액을 모두 배출하였다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media (with 10% FBS)와 collagenase type IV (300 u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation을 한다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 세포가 잘 분리 되도록 한다. 간 조직을 HBSS (Ca^{2+} , Mg^{2+} free)를 사용하여 mesh에서 갈아준다. 이렇게 얻은 시료를 원심 분리하여 획득한 세포는 63%와 36%의 percoll을 이용하여 세포들 중에서 lymphocyte만을 분리하여 실험에 사용하였다¹³⁾.

(2) 세포 배양 및 세포생존율 측정

분리한 lymphocyte를 활성화시키기 위하여 anti-CD3와 anti-CD28을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하여 24시간 동안 RPMI 1640 media에 10%의 FBS와 antibiotic (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리한 complete media를 이용하여 배양을 한다. 24시간 후 세포의 계대배양을 실시하며 분획별로 얻은 건조 추출물을 RPMI 1640 media에 1%로 희석하여 10%의 FBS와 antibiotic (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함께 처리하여 배양액으로 이용하였으며, 72시간 동안 36°C에서 세포 배양을 실시하였다. 배양된 세포를 harvest하는 시간에서 12~18시간 전에 [^3H]-thymidine을 1 μCi 처리해준다. 세포를 β -counter (Beckman)에 사용하는 safe cuvette에 500 μl 씩 분주한 다음 cocktail solution을 2 ml첨가 한 후, thymidine의 uptake를 β -counter로 확인하였다.

3) 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride (이하 AAPH)에 의한 산화적 스트레스 유발

6주령 수컷의 SD rat의 실험동물에게 AAPH를 매일 50 mg/kg씩 1주일간 복강에 투여 하여, 산화적 스트레스를 유발하였다.

4) 간조직 내 lymphocyte 및 뇌세포에서의 분획별 항산화 효과 측정

AAPH로 산화적 스트레스를 유발한 실험동물에서 간과 뇌를 적출하여 clean bench 내에서 세포를 분리하여 3일간 夜交藤의 분획별로 얻은 건조 추출물을 RPMI 1640 media에 1%로 희석하여 10%의 FBS와 antibiotic (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함께 처리한 뒤 배양을 실시한다. 3일 후, 원심분리를 실시하여 세포 배양액의 상층액만을 취하여 Super oxide dismutase (이하 SOD)와 glutathione (이하 GSH), Nitric oxide (이하 NO) assay, lipid peroxidation, catalase를 실시하였다.

(1) 간조직내 lymphocyte의 분리

AAPH로 산화적 스트레스를 유발한 실험동물의 간 조직을 사용하였다. EtOEt를 이용하여 실험동물을 마취시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS (Ca^{2+} , Mg^{2+} free)를 투여하며 복부의 대동맥을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시켜 주었다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media (with 10% FBS)와 collagenase type IV (300 u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation을 하고, 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 세포가 잘 분리 되도록 하였다. 간 조직을 HBSS (Ca^{2+} , Mg^{2+} free)를 사용하여 mesh에서 갈아주고, 이렇게 얻은 시료를 원심 분리하여 획득한 세포는 63%와 36%의 percoll을 이용하여 간세포들 중에서 lymphocyte만을 분리하여 실험에 사용하였다¹⁴⁾.

(2) 뇌 세포의 분리

AAPH로 산화적 스트레스를 유발한 실험동물의 뇌 조직을 사용하였다. EtOEt를 이용하여 실험동물을 마취시킨 후, 두개골을 절개하여 뇌 조직을 적출하였다. 뇌 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media (with 10% FBS)와 collagenase type IV (300 u/ml)를 넣고 실온에서 30분간 incubation을 하고, 30분 후 뇌 조직을 RPMI 1640 media (with 10% FBS)를 사용하여 mesh에서 갈아주었다. 이렇게 얻은 시료를 원심 분리하여 세포를 RPMI 1640 media에 washing을 실시하고, cell strainer를 이용하여 지질을 걸러주고, 걸러진 세포들은 RPMI 1640 media에 2회 washing을 실시한 후 사용하였다.

(3) SOD activity

SOD 활성도는 SOD assay kit (Dojindo, Japan)을 이용하였다. 위에서 분리한 세포의 배양액을 사용하였으며, sample solution을 96 well plate에 각 well과 blank 2에 20 μl 씩 분주 하였다. Blank 1과 blank 3에 D.W. 20 μl 씩을 분주한 뒤, WST (highly water-soluble tetrazolium salt) working solution을 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 모든 well에 첨가하였다. Blank 2와 blank 3 well에 dilution buffer를 20 μl 씩 분주하고, enzyme working solution을 각 sample well과 blank 1에 20 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 분주 하였다. 20분 동안 37°C에서 incubating을 실시하고 450 nm에서 흡광도를 측정하고 SOD 활성도를 환산하였다.

SOD activity (inhibition rate %)

$$= \frac{[(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})]}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

(4) GSH 함량

GSH 함량 측정은 kit (Dojindo, Japan)를 이용하였다. Coenzyme working solution을 140 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 분주하고, enzyme working solution을 20 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 분주 하였다. Pre-incubation을 36°C에서 5분 동안 실시한 뒤, GSH standard solution과 sample 세포 배양액을 20 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로

분주하고 36°C에서 10분간 incubation을 실시하였다. 10분 후, substrate working solution을 20 μ l/well로 분주하고, 다시 36°C에서 10분간 incubation을 실시한 뒤 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 O.D.값을 측정하고 GSH 함량으로 환산하였다.

(5) NO assay

NO함량은 kit (Oxford biomedical research, USA)를 이용하였다. 세포 배양액의 sample과 standard solution을 96 well plate에 80 μ l/well로 분주하고, buffer solution을 20 μ l/well로 분주하였다. 그리고 DAN solution (fluorescence reagent)을 10 μ l/well로 첨가하고 15분간 36°C에서 incubation을 실시하였다. 그 후에 NaOH solution을 10 μ l/well로 분주하고, ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 O.D.값을 읽어 NO 함량 값으로 환산하였다.

(6) Lipid peroxidation

Lipid peroxidation assay kit (Oxford biomedical research, USA)를 이용하였다. Sample인 세포 배양액을 E-tube에 200 μ l씩 분주하고, dilution R1을 각 tube에 650 μ l씩 분주하고, 37% HCl 150 μ l씩 분주한 뒤 sample을 짧게 vortex를 실시하였다. 그리고 45°C에서 60분간 incubation을 실시하고, 60분 후 15,000G (약 12,240 rpm)으로 centrifuge를 실시하고, 상등액 200 μ l를 96 well plate에 옮겨 준 뒤 ELISA reader를 이용하여 586 nm에서 O.D.를 측정하여 malondialdehyde (이하 MDA)함량으로 변환하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 ANOVA multi *t*-test (JAVA, Bonferroni Ver II)를 실시하여, *p*값이 0.05 미만일 경우에 유의성을 인정하였다.

성적

1. 분획별 수득률

夜交藤을 전탕하여 얻은 엑스 20g을 가지고 여러 가지 용매로 분획하여 얻은 양을 %로 환산한 결과이다. Aqueous 층을 제외하고 줄기는 EtOEt층에서 17%로 가장 높은 수득률을 보였고, EtOAc층에서 2.5%로 가장 낮은 수득률을 보였으며 *n*-BuOH층에서 14.5%를 보였다 (Table 1).

Table 1. Yield of Various Fraction Extract from Polygonati Multiflori Caulis

Ex	<i>n</i> -hexane	EtOEt	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	Aqueous
PMC	9%	17%	2.5%	14.5%	24%

2. 분획별 세포 생존율

세포 배양을 하는 동안 분획별로 얻은 시료를 1w/v%로 희석하여 세포배양액에 처리하여 세포의 증식을 확인하였다. Control (대조군)에 비해 전탕 및 그 분획 추출물을 처리한 세포의 증식이 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

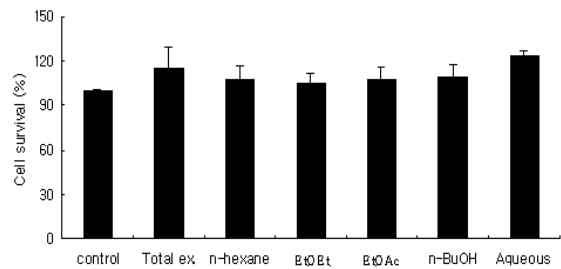


Fig. 2. Cell proliferation with total extract and various fractions of Polygonati Multiflori Caulis decoction

The rat cells were seeded at a suspended density of 5×10^5 cell/well on a 24 well cell culture plate. The cells were cultured in the medium of RPMI 1640 with 10% FBS, antibiotics, and total extract or various fractions of Polygonati Multiflori Caulis and 1 μ Ci/[3H]-thymidine, in triplicate. After 72 h, the cells were harvested and counted with β -counter. And CPM was converted into cell survival percentage. Values represent the means \pm SEM of 3 experiments.

3. 뇌세포에서의 항산화 효과

1) SOD activity

산화적 스트레스를 받은 실험동물의 뇌세포를 분리하여, 전탕 및 분획을 분주하고 3일간 배양을 하여 얻은 세포 배양액에서 SOD activity를 측정하였다. Control에 비하여 모든 실험군에서 SOD activity가 증가하였다(Fig. 3).

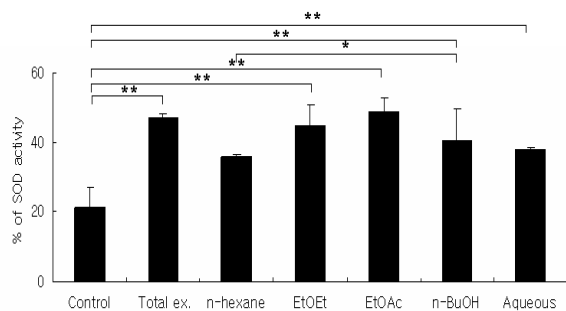


Fig. 3. Effect of Polygonati Multiflori Caulis decoction extract on the SOD activity in oxidized rat brain cell culture supernatant

Brain cells were isolated from the oxidized rats that were injected intraperitoneally (i.p.) with AAPH for 7 days (50 mg/kg/day). The cells were cultured with various fraction extract of Polygonati Multiflori Caulis for 3 days. The brain cell culture supernatant was removed and SOD activity was estimated at 450nm by ELISA. Values represent the means \pm SEM of 3 mice. ** *p* < 0.01, * *p* < 0.05 by ANOVA test.

2) GSH

산화적 스트레스를 받은 실험동물의 뇌세포를 분리하여, 전탕 및 분획을 분주하고 3일간 배양을 하여 얻은 세포 배양액에서 GSH의 함량을 측정하였다. 모든 배양액에서 control에 비하여 GSH 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

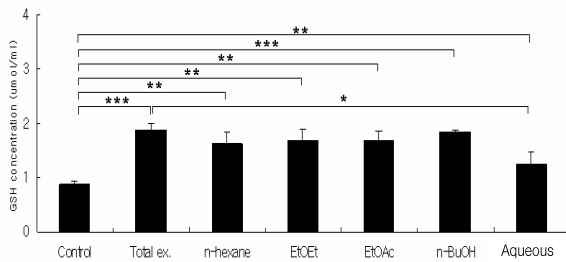


Fig. 4. Effect of Polygonati Multiflora Caulis decoction extract on the concentration of GSH in oxidized rat brain cell culture supernatant

Brain cells were isolated from the rats that were injected intraperitoneally (i.p.) with AAPH for 7days (50 mg/kg/day). The cells were cultured with various fraction extract of Polygonati Multiflora Caulis for 3 days. The brain cell culture supernatant was removed and the concentration of GSH was estimated at 450 nm by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 mice. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ by ANOVA test.

3) NO 함량

산화적 스트레스를 받은 실험동물의 뇌세포를 분리하여, 전탕 및 분획을 분주하고 3일간 배양을 하여 얻은 세포 배양액에서 NO 함량을 측정하였다. 모든 분획물에서 control에 비하여 NO 함량이 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

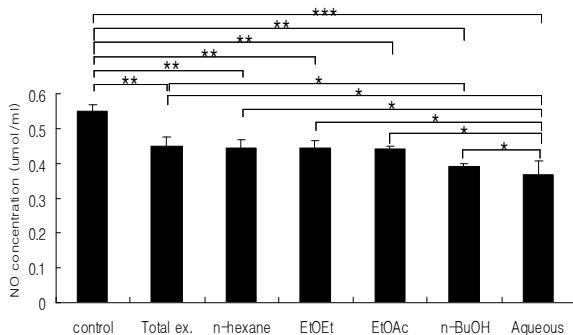


Fig. 5. Effect of Polygonati Multiflora Caulis decoction extract on the concentration of NO in oxidized rat brain cell culture supernatant

Brain cells were isolated from the rats that were injected intraperitoneally (i.p.) with AAPH for 7 days (50 mg/kg/day). The cells were cultured with various fraction extract of Polygonati Multiflora Caulis for 3 days. The brain cell culture supernatant was removed and the concentration of NO was estimated at 450 nm by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 mice. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ by ANOVA test.

4) Lipid peroxidation

산화적 스트레스를 받은 실험동물의 뇌세포를 분리하여, 전탕 및 분획을 분주하고 3일간 배양을 하여 얻은 세포 배양액에서 MDA의 함량을 측정하였다. 모든 분획물에서 control에 비하여 통계적으로 유의한 변화를 나타내지 않았다(Fig. 6).

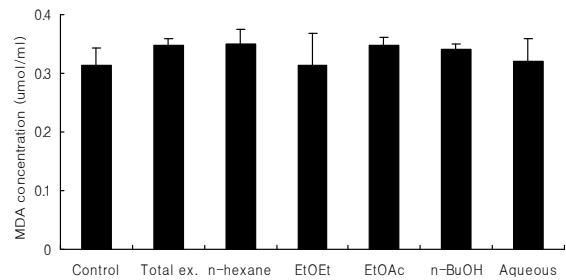


Fig. 6. Effect of Polygonati Multiflora Caulis decoction extract on the concentration of MDA in oxidized rat brain cell culture supernatant

Brain cells were isolated from the rats that were injected intraperitoneally (i.p.) with AAPH for 7 days (50 mg/kg/day). The cells were cultured with various fraction extract of Polygonati Multiflora Caulis decoction for 3 days. The brain cell culture supernatant was removed and the concentration of MDA was estimated at 586 nm by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 mice.

4. 간세포에서의 분획별 항산화 효과 측정

1) SOD activity

(1) 분획별 SOD activity 비교

산화적 스트레스를 받은 실험동물의 간세포를 분리하여, 전탕 및 분획을 분주하고 3일간 배양을 하여 얻은 세

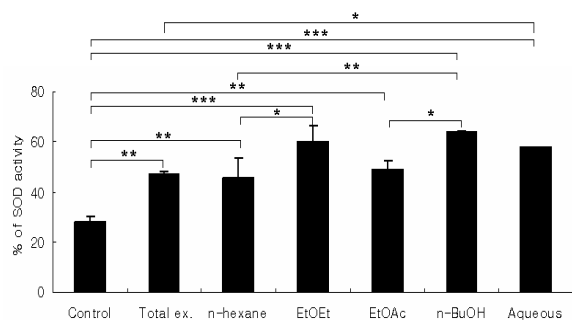


Fig. 7. Effects of Polygonati Multiflora Caulis decoction extract on the SOD activity in oxidized rat liver cell culture supernatant

Liver cells were isolated from the rats that were injected intraperitoneally (i.p.) with AAPH for 7days (50 mg/kg/day). The cells were cultured with various fraction extract of Polygonati Multiflora Caulis for 3 days. The liver cell culture supernatant was removed and SOD was estimated at 450 nm by ELISA. Values represent the means ± SEM of 3 mice. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ by ANOVA test.

포 배양액에서 SOD activity를 측정하였다. Control에 비하여 모든 분획에서 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 7).

2) GSH

산화적 스트레스를 받은 실험동물의 간세포를 분리하여, 전탕 및 분획을 분주하고 3일간 배양을 하여 얻은 세포 배양액에서 GSH의 함량을 측정하였다. 모든 분획에서 control에 비하여 GSH 함량이 높게 나타났다(Fig. 8).

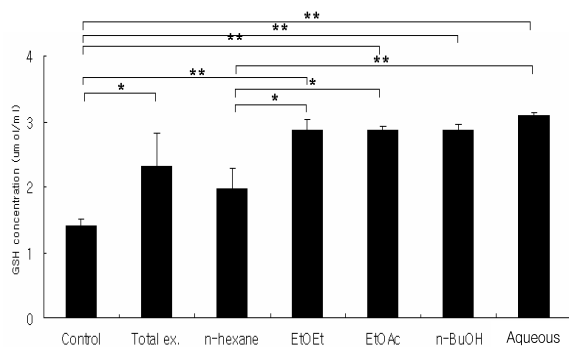


Fig. 8. Effect of Polygonati Multiflori Caulis decoction extract on the concentration of GSH in oxidized rat liver cell culture supernatant

Liver cells were isolated from the rats that were injected intraperitoneally (i.p.) with AAPH for 7 days (50 mg/kg/day). The cells were cultured with various fraction extract of Polygonati Multiflori Caulis for 3 days. The liver cell culture supernatant was removed and the concentration of GSH was estimated at 450 nm by ELISA. Values represent the means \pm SEM of 3 mice. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by ANOVA test.

3) NO 함량

산화적 스트레스를 받은 실험동물의 간세포를 분리하

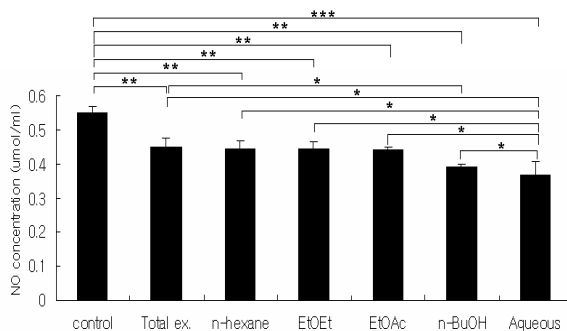


Fig. 9. Effect of Polygonati Multiflori Caulis decoction extract on the concentration of NO in oxidized rat liver cell culture supernatant

Liver cells were isolated from the rats that were injected intraperitoneally (i.p.) with AAPH for 7days (50 mg/kg/day). The cells were cultured with various fraction extract of Polygonati Multiflori Caulis for 3 days. The liver cell culture supernatant was removed and the concentration of NO was estimated at 450 nm by ELISA. Values represent the means \pm SEM of 3 mice. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ by ANOVA test.

여, 전탕 및 분획을 분주하고 3일간 배양을 하여 얻은 세포 배양액에서 NO 함량을 측정하였다. Control에 비하여 모든 분획에서 NO 함량이 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

4) Lipid peroxidation

산화적 스트레스를 받은 실험동물의 간세포를 분리하여, 전탕 및 분획을 분주하고 3일간 배양을 하여 얻은 세포 배양액에서 MDA의 함량을 측정하였다. 모든 분획에서 control에 비하여 MDA 함량이 감소하였다(Fig. 10).

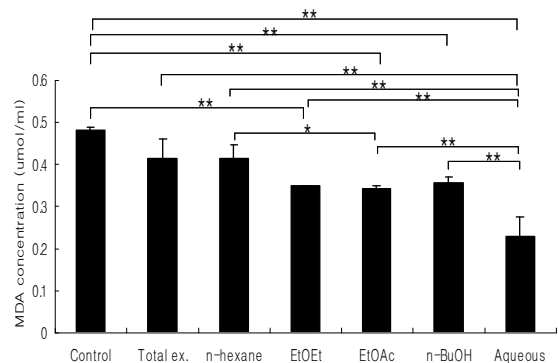


Fig. 10. Effect of Polygonati Multiflori Caulis decoction extract on the concentration of MDA in oxidized rat liver cell culture supernatant

Liver cells were isolated from the rats that were injected intraperitoneally (i.p.) with AAPH for 7 days (50 mg/kg/day). The cells were cultured with various fraction extract of Polygonati Multiflori Caulis decoction for 3 days. The liver cell culture supernatant was removed and the concentration of MDA was estimated at 586 nm by ELISA. Values represent the means \pm SEM of 3 mice. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ by ANOVA test.

고찰

夜交藤의 기원식물인 하수오 *Polygonum multiflorum* Thunb.는 중국에서 들어온 덩굴성 약용식물로서 전체에 털이 없고 뿌리는 땅속으로 번으면서 때때로 둥근 덩이 뿌리를 형성한다. 잎은 호생하며 잎자루가 있고 길이 3~6cm, 너비 2.5~4.5cm로서 끝이 뾰족하고 밑 부분이心臟底이며 가장자리가 밋밋하다¹⁵⁾.

夜交藤은 《本經逢原》²⁾에 何首烏의 異名으로 처음 수재 되었으며 《本草綱目》³⁾에 “何首烏 莖葉 風瘡 疥癬 作痒 煎湯洗浴甚效”이라 기록된 이후, 임상에서 養心安神, 祛風, 通絡의 효능이 있어 失眠, 多夢, 血虛身痛, 風濕痺痛, 皮膚瘙癢症, 瘡腫, 疥癬, 癩癧 등을 치료 한다⁴⁾.

하수오의 성분으로는 塊根에 chrysophanol, emodin, rhein, chrysophanol anthrone⁴⁾이, 藤莖에는 emodin, physcion, β -sitosterol, anthraglycoside, polygoacetophenoxide 등이 있고⁷⁾, 최근에는 stilbene glycoside와 gallates, proanthocyanidin 이 함유되어 있음이 보고 되고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

하수오의 약리 작용에 대해서는 Chan 등⁷⁾은 뇌의 국

소 허혈성 변화에 대한 방지효과가 있어 장기적으로는 뇌경색을 유의성 있게 줄일 수 있는 효과가 있음을 밝혔다. 또한 Um 등⁸⁾과 Zhang 등¹⁹⁾은 하수오가 뇌의 항산화 작용을 촉진시켜, Alzheimer's disease를 유발하는 것으로 알려진 amyloid β protein를 감소시켜 인지력을 향상시키는 것으로 보고하였고, Li 등⁹⁾은 뇌의 도파민 신경 전달계의 퇴행으로 발생하는 파킨슨씨병에 대해서 신경보호 역할이 있음을 설명하였고, Fang 등¹⁰⁾과 Kang 등²⁰⁾은 동맥경화 방지효과가 있음을, Yim 등¹⁴⁾은 심장의 허혈 및 재관류 손상에 대한 심근 보호 작용을, Song 등²¹⁾은 항노화 작용을 밝혔다.

항산화제는 물질의 변질방지, 인체의 노화방지 및 성인병 예방 등의 기능을 할 수 있는 물질이며²²⁾, 현재 사용되는 항산화제로는 BHA (butylated hydroxy anisole), BHT (butylated hydroxy toluene), PG (propyl gallate) 등과 같은 합성 항산화제와 토코페롤과 같은 천연 항산화제가 개발되어 이용되고 있다. 그러나 BHA, BHT는 우수한 효과가 있지만 독성이 문제가 되며, 토코페롤은 높은 가격이 단점으로²³⁾, 이들을 대체할 수 있는 효과적이고도 안전한 항산화제의 개발이 요구되고 있다.

이에 저자는 하수오의 뿌리줄기에서 항산화 효과가 보고되었는데, 줄기에서는 항산화 효과가 보고되지 않았으므로, 夜交藤(《중화인민공화국약전》에 근거하여 잎을 제거한 것)이 항산화 효과와 관련이 있을 것으로 사료되어, 夜交藤의 항산화 효과를 관찰하였다. 특히 夜交藤이 養心安神의 효능으로 쓰이기 때문에 뇌세포에서의 항산화 효과를 관찰하였다.

본 실험에서 夜交藤을 전탕 추출한 후, 전탕 추출물을 여러 가지 용매로 분획하였다. Aqueous층을 제외하고는 줄기는 EtOEt층에서 17%로 가장 높은 수득률을 보였고, EtOAc 층에서 2.5%로 가장 낮은 수득률을 보였으며 *n*-BuOH층에서 14.5%를 보였다.

세포생존율에서 분획물의 세포생존율을 비교한 결과 control (대조군)에 비해 전탕 및 그 분획 추출물을 처리한 세포의 증식이 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다.

AAPH는 수용성 azo 화합물의 일종으로서 열분해에 의해서 자유기를 생성하는데, 복강 내로 투여되면 수 분 내에 혈류를 타고 전신 순환하며 산소분자와 반응하여 peroxy radical을 생성하고, 여러 형태의 생물학적 분자와 결합반응을 일으키면서 생체막의 구조를 붕괴시키는 것으로 생각되고 있다²⁴⁾.

본 실험에서는 AAPH를 SD Rat에 주사하여 급성적 산화 스트레스를 유발한 다음, 전탕액을 투여하고, 뇌와 간세포에서 각각 SOD activity, GSH 함량, NO 함량, MDA 함량을 측정하였다. SOD는 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는 효소로서 진핵세포에서는 세포질의 copper and zinc-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD)와 사립체의 manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD), 원핵세포에서는 세포질의 Mn-SOD와 원형질막 외강의 iron-superoxide

dismutase (Fe-SOD) 등 여러 가지 동종효소가 알려져 있다²⁵⁾.

뇌세포에서 夜交藤의 SOD activity를 측정한 결과 control에 비하여 SOD activity가 증가하였고, EtOAc 분획에서 높게 나타났으며, 간세포에서는 control에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였고, 특히 *n*-BuOH 분획에서 가장 높게 나타났다. 또한 *n*-BuOH와 Aqueous를 제외한 모든 분획물에서 간세포에 비하여 뇌세포의 SOD activity가 높게 나타났다.

GSH는 hydrogen peroxidase를 H₂O로 환원시켜서 산화성 스트레스에 대하여 세포를 보호하는 작용이 있다²⁶⁾.

뇌세포에서 夜交藤의 GSH 농도는 control에 비하여 GSH 함량이 유의하게 증가하였으며 간세포에서는 control에 비해 모든 분획에서 높았고, 특히 EtOEt 분획에서 가장 높게 나타났다. 또한 모든 분획에서 간세포가 뇌세포에 비하여 높은 GSH 함량을 나타내었다.

질소 중간 대사물 중 하나인 NO는 면역전달물질인 cytokine의 영향으로 면역세포로부터 생성되어, 염증반응 부위에 유리됨으로써 Fe-S를 함유하는 효소의 작용을 억제시키거나 DNA에 손상을 미쳐 항미생물작용이나 항암 작용을 한다고 알려졌다. 또한 AAPH에 의한 세포손상과 관련하여, NO는 맥관계(vascular system)에서 내피 유래 확장인자(endothelium-derived relaxation factor)로서 작용하며²⁷⁾, 혈소판응집(platelet aggregation)과정에 관여한다²⁸⁾.

뇌세포와 간세포에서 夜交藤 전탕액의 NO 함량은 control에 비하여 NO 함량이 유의하게 감소하였고, *n*-BuOH 분획과 aqueous 분획에서는 낮은 NO 함량을 나타냈다.

MDA는 세포막에서 다중불포화 지방산과 새로운 지질 자유기가 반응하여 산소 radical 화합물이 생성되고, 과잉 산소가 존재할 때 과산화 radical이 지질과산화라고 하는 연쇄반응을 일으키게 되어 지질 과산화물의 지표로 널리 이용되고 있다^{29,30)}.

뇌세포에서 夜交藤의 MDA함량은 모든 분획물에서 control에 비하여 통계적으로 유의한 변화를 나타내지 않은 반면, 간세포에서는 control 보다 감소하였고, 특히 aqueous 분획에서 유의한 감소를 나타냈다.

이상의 결과를 종합하면, 산화 쥐의 뇌세포 및 간세포에서 항산화 효능은 분획 별로 다소 차이가 있었으나 夜交藤의 항산화 효능이 인정되었으며, 특히 뇌세포에서의 항산화 효능은 養心安神의 효능으로 쓰이는 夜交藤의 효능과 연관이 있을 것으로 사료된다.

결론

夜交藤을 전탕 추출한 후, 전탕 추출물을 여러 가지 용매로 분획하여 세포 생존율 및 산화 쥐의 뇌 및 간세포에서의 항산화 효과를 측정한 결과, 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 세포 생존율은 1 w/v%에서 세포의 증식이 증가하는 경향이 나타났다.
2. 산화 쥐의 뇌세포에 전탕액 및 전탕액의 분획물을 처리한 결과, SOD activity, GSH 함량이 증가하고, NO 함량이 감소하였다.
3. 산화 쥐의 간세포에 전탕액 및 전탕액의 분획물을 처리한 결과, SOD activity, GSH 함량이 증가하고, NO 함량, MDA 함량이 감소하였다.
4. *n*-BuOH와 Aqueous를 제외한 모든 분획물에서 간세포에 비하여 뇌세포의 SOD activity가 높게 나타났다.
5. 모든 분획에서 간세포가 뇌세포에 비하여 높은 GSH 함량을 나타내었다.
6. Aqueous 분획에서는 간세포가 뇌세포에 비하여 낮은 MDA 함량을 나타내었으며, total extract, *n*-hexane, EtOEt, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획에서는 뇌세포가 간세포에 비하여 낮은 MDA 함량을 나타내었다.

따라서 야교등은 산화 쥐의 뇌세포 및 간세포에서 항산화 효능은 분획별로 다소 차이가 있었으나 항산화 효능이 인정되었으며, 특히 뇌세포에서의 항산화 효능은 養心安神의 효능으로 쓰이는 夜交藤의 효능과 관련이 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 경원대학교 연구비 지원을 받았으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회 편저. 本草學. 서울 : 영림사. 1994 : 583-4.
2. 張璠. 本經逢原. 北京 : 中國中醫藥出版社. 1996 : 121.
3. 李時珍. 本草綱目. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 1291.
4. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 上海 : 上海科學技術出版社. 1999 ; (2) : 677-8.
5. 國家藥典委員會 編. 中華人民共和國藥典 2005年版 1部. 北京 : 化學工業出版社. 2005 : 187.
6. 田代華. 實用中藥辭典. 北京 : 人民衛生出版社. 2002 : 1209.
7. Chan YC, Wang MF, Chen YC, Yang DY, Lee MS, Cheng FC. Long-term administration of *Polygonum multiflorum* Thunb. reduces cerebral ischemia-induced infarct volume in gerbils. The American journal of Chinese medicine. 2002 ; 31(1) : 71-8.
8. Um MY, Choi WH, An JY, Kim SR, Ha TY. Protective effect of *Polygonum multiflorum* Thunb on amyloid β -peptide 25-35 induced cognitive deficits in mice. Journal of ethon pharmacology. 2006 ; 1004(1/2) : 144-8.
9. Li X, Matsumoto K, Murakami Y, Tezuka Y, Wu Y, Kadota S. Neuroprotective effects of *Polygonum multiflorum* on nigrostriatal dopaminergic degeneration induced by paraquat and maneb in mice. Pharmacology, biochemistry and behavior. 2005 ; 82(2) : 345-52.
10. Fang W, Xhang HX, Wang LY, Qin YW, Liu B, Wu Y, He GQ, Wang W, Du L. The inhibiting effect of *Polygonum multiflorum* total glycoside on the arteriosclerotic lesion formation. Chinese journal of arteriosclerosis. 2005 ; 13(2) : 175-8.
11. 國家醫藥管理局. 植物藥有效成分手冊. 北京:人民衛生出版社.1986 : 384.
12. Sozmen EY, Tanyakin T, Onat T, Kufay F, Erlacin S. Ethanol-induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes. Eur J Clin Chem Clin Biochemistry. 1994 ; 32 : 741-74.
13. RM Popovici, M Lu, S Bhatia, GH Faessen, AJ Giaccia and L, C Giudice. Hypoxia Regulates Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1 in Human Fetal Hepatocytes in Primary Culture: Suggestive Molecular Mechanisms for in Utero Fetal Growth Restriction Caused by Uteroplacental Insufficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Jun ; 86(6) : 2653-9.
14. 이창복. 대한식물도감. 서울 : 향문사. 2003 : 260.
15. Nonaka GI, Miwa N, Nishioka I. Stilbene glycoside gallates proanthocyanidins from *Polygonum multiflorum* Pergamon press. 1982 ; 21(2) ; 429-32.
16. Cao Xueli, Tian Yu, Zhang Tianyou, Shen Pingniang, Zhu Lianhua, Ito Yoichiro. HSCCC separation of a stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum*. Marcel Dekker. 1998 ; 21(18) ; 221-5.
17. Li Shuang, LV, Gu X, Ho CT, Tang J. Stilbene glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb and their in vitro antioxidant activities. Journal of food lipids. 2006 : 131-44.
18. Zhang L, Xing Y, Ye CF, Ai HX, Wei HF, Li L. Learning-memory deficit with aging in APP transgenic mice of Alzheimer's disease and intervention by using tetrahydroxystilbene glucoside. Elsevier. 2006 ; 173(2) ; 246-54
19. Kang MJ, Kim JI, Joo HJ, Seo TJ, Kim HA, Han JH. The inhibitory activity of *Polygonum multiflorum*

- Thunb. and its effect on postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutritional sciences*. 2005 ; 8(4) : 226-30.
20. Yim TK, Wu WK, Mak HF, Ko KM. Myocardial protection against ischemia-reperfusion injury by a *Polygonum multiflorum* extract supplemented & Dang-Gui decoction for enriching blood. Georg Thieme Verlag. 1998 ; 64(7) ; 607-11.
 21. Song SJ, Li FF, Yue H. Study on the anti-aging effects of radix *Polygonum multiflorum*. *Journal-Hebei medical university*. 2003 ; 24(2) : 90-1.
 22. Farag RS, Badei AZMA, Hewedi FM, El-Baroty GSA. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *JAOCS*. 1989 ; 66 : 792-9.
 23. Choe SY, Yang KK. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxy toluene(BHT), and butylated hydroxy anisole(BHA). *Iorean J Food Sci Technol*. 1982 ; 14 : 283-8.
 24. Terao K, Niki E. Damage to biological tissues induced by radical initiator 2,2'-azobis (2-aminodinopropane) hydrochloride and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *J Free Radical in Biol Med*. 1986 ; 2 : 193-201.
 25. Proctor PH, Miquel J, Quintaniha AT and Weber H. Free radicals and human disease, In *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine vol I*. CRC Press. 1989 : 209-22.
 26. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal ; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther*. 1991 ; 51(2) : 155-94.
 27. Teo S, Pohl L, Halpert J. Production of superoxide anion radicals during the oxidative metabolism of amino-chloramphenicol. *Biochemical Pharmacology*. 1986 ; 35(24) : 4584-6.
 28. Radamski MW, Palmer RM, Moncada S. An. L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *National Academy of Science*. 1990 ; 87(13) : 5193-7.
 29. Piche LA, Draper HH, Cole PD. Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs. a concentrate *n*-3 fatty acid. *Lipids*. 1998 ; 23 : 370-1.
 30. Sumida S, Tanaka K, Kitao H and Nakadomo H. Exercise induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after Vitamin E supplementation. *Int J Biochemistry*. 1989 ; 21 : 835-8.