

川芎茶調散加味方 주정추출물이 산화적 손상 및 염증에 미치는 영향

박지원^{1#}, 심부용¹, 이해진², 김동희^{1*}

1 : 대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2 : 대전대학교 미용의학

Effect of Cheongungdajosan-gamibang on oxidative damage and inflammation

Ji Won Bak^{1#}, Boo-Yong Sim¹, Hae jin Lee², Dong Hee Kim^{1*}

1 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,

2 : Department of College of Beauty & Health Medicine, Daejeon University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was verification of the anti-inflammation and anti-oxidant effect of Cheongungdajosan-gamibang extract (CG) in mouse macrophage, RAW 264.7 cells.

Methods : We have basically using LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cell toxicity was determined by MTT assay. To evaluate the anti-inflammatory effect of Cheongungdajosan -gamibang, amount of nitric oxide(NO) was measured using the NO detection kit and the IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression was measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Also, free radical scavenging assay has tested for DPPH and ABTS radical activity as well as the contents of total polyphenol.

Results : In this study, 96.6% or higher cell viability was observed in all tested groups from 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ in RAW 264.7 cells. The RAW 264.7 cells were induced by lipopolysaccharide (LPS) and CG 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$. The CG decreased nitric oxide (NO) production activity dose dependently, especially at 100 $\mu\text{g/ml}$ of 55%. The production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were decreased by 51%, 78% and 35% in CG treated 100 $\mu\text{g/ml}$. CG showed dose-dependent suppression activity of reactive oxygen species (ROS) production, especially at 100 $\mu\text{g/ml}$ of 37%. DPPH radical scavenging activity and ABTS cation decolorization were activated over 86% and 88% in CG at 1,000 $\mu\text{g/ml}$ concentration.

Conclusions : According to the results, we thought that CG showed anti-inflammatory and antioxidant activities on the RAW 264.7 cells in mouse macrophage. Therefore, this research is expected to provide the fundamental data about the natural material analysis of relating to the anti-inflammation and antioxidant.

Key words : Cheongungdajosan-gamibang, Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Free radical, Cytokine

서론

인체에는 산화촉진물질과 산화억제물질이 균형을 이루고 있는데 여러 가지 요인에 의해 그 균형이 무너지게 되면 산화적 스트레스를 일으키게 되며 점차 세포손상과 병리적 질환을 야기키치게 된다. 산화적 스트레스의 직접적인 원인이 되는 활성 산소종과 활성 질소종은 인체가 활동하기 위한 에너지 공급 대사과정에서 이루어지는 생화학적 산화반응 중에 발생이 된다¹⁾. 일반적으로 노화, 발암, 심장병 및 순환계 등의 문

제를 억제하기 위해 BHT (butylated hydroxy toluene), BHA (butylated hydroxy anisole), PG(propylgallate), TBHQ (tertiary butylhydroquinone)등이 경제적이고, 우수한 항산화제로써 널리 사용되고 있으나, 복용기간이 길어지면 간, 폐, 신장, 위장 및 순환계에 심각한 부작용을 초래한다^{2,3)}.

염증은 체내에서 외부로부터의 물리적, 화학적 자극이나 세균의 감염으로 인해 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 생체 방어 기전의 하나이기도 하지만, 각종 질환을 일으키는

*교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 대학로 62 대전대학교 한의과대학
· Tel : 042-280-2623 · FAX : 042-280-2624 · E-mail : dhkim@dju.kr

#제1저자 : 박지원, 대전광역시 동구 대학로 62 대전대학교 한의과대학
· Tel : 042-280-2828 · FAX : 042-280-2624 · E-mail : jiwon3240@naver.com
· 접수 : 2014년 6월 27일 · 수정 : 2014년 7월 18일 · 채택 : 2014년 7월 23일

원인이 되기도 한다. 여러 자극에 의해 과량 생산된 염증 매개인자는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) 등과 같은 사이토카인을 생산하여 다양한 염증반응을 일으킨다⁴⁾. 염증반응이 만성적으로 일어나면 염증 매개물질이 과도하게 분비되어 암세포의 성장 촉진, 인슐린의 저항성 증가, 동맥경화의 악화 등 다양한 병리학적 기전에 관여한다고 알려져 있다⁵⁾.

川芎茶調散加味方の 기본방인 川芎茶調散은 宋代 陳⁶⁾의 《太平惠民和劑局方》에 최초로 수록된 처방이며, 元代 危⁷⁾의 《世醫得效方》에는 茶調散으로 기재되어있다. 그 처방은 川芎, 荊芥, 甘草, 防風, 白芷, 薄荷, 細辛, 羌活 8종의 약재로 구성되어 있고, 外感風邪로 인한 頭痛, 傷風壯熱, 目眩鼻塞, 鼻塞聲重 등의 증상에 많이 사용되는 처방이며, 임상에서는 증상의 경중, 중증도에 따라 원방에 다양한 한약재를 가감하여 활용하고 있다^{6,7)}. 기존의 川芎茶調散에 대한 실험적 연구로는 전⁸⁾의 '高血壓 및 高脂血症에 대한 川芎茶調散의 實驗的研究', 주⁹⁾의 '川芎茶調散의 鎮痛效果 및 作用機轉에 관한 研究' 등이 있으나, 川芎茶調散加味方の 항산화와 항염증 효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

항산화 활성을 지닌 천연 원료들은 염증성 질환에도 효과를 보인다고 알려져 있어¹⁰⁾, 이에 저자는 원방인 川芎茶調散에 홍¹¹⁾의 연구에서 항산화 효능이 입증된 화피를 가미하여 川芎茶調散加味方の 항산화 효능과 항염증 효능을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용한 천궁다조산가미방 (Cheongungdajosan-gamibang 이하 CG로 표기)의 구성 약재들은 (주)음니허브에서 구입하였고, 대전대학교 지역혁신센터 난치성 면역질환의 동서생명의학 연구센터(TBRC)에서 정선 후 사용하였다. 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of CG

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
川芎	Cnidium officinale Makino	12
荊芥	Schizonepeta tenuifolia var. japonica	12
甘草	Glycyrrhiza uralensis	6
防風	Ledebouriella seseloides	6
白芷	Angelica dahurica	6
檉皮	Betula platyphylla Suk. var. japonica Hara	6
辛夷	Magnolia denudata Desrousseaux	4
薄荷	Mentha arvensis var. piperascens	3
細辛	Asiasarum heterotropoides F. Maekawa var. mandshuricum F. Maekawa	3
Total amount		58

2. 세포 배양

실험에 사용된 RAW 264,7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였고, 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 mL을 넣어 부유시켜 세포배양기

(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

3. 시약 및 기기

사용된 시약은 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 Sigma-Aldrich 사 (st. Louis, MO, USA), Folin-Ciocalteu's phenol reagent는 Merck사 (Darmstadt, Germany), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.)을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Flow cytometry system (BD Biosciences immunocytometry systems, U.S.A.), 주정추출에 사용된 주정은 (주)주정판매월드(Jeonju, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

4. 시료 추출

CG 2첩에 80% 주정(C₂H₅OH) 1000 mL을 넣고 3시간 동안 환류추출 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 분말 9.4 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고(-80°C)에서 보관하면서 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

5. 세포독성 측정

Raw 264,7 세포는 96 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 새로운 배양액으로 교체하였고, CG를 각각 1, 10, 100 (μg/mL)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μL의 WST solution을 첨가하여 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용해 흡광도의 변화를 측정 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

6. 항산화 효능 측정

1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용하는 방법으로 측정하였다. 추출 시료용액 1 mL에 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에 Na₂CO₃ 포화용액 1 mL와 7.5 mL 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용

하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였으며 측정단위로는 GAE(Gallic acid equivalent)/g를 사용하였다.

2) 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) radical 소거능 측정

자유라디칼 소거 활성 실험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로 주정에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μ l와 CG 1, 10, 100, 1,000 (μ g/ml)의 농도가 되게 100 μ l 씩 각각 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응 시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 증류수를 넣었으며, DPPH 용액대신 주정을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

3) 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical 소거능 측정

ABTS assay 방법은 기존에 보고된 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. CG를 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 (μ g/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 (ABTS·⁺)을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 0.7±0.03 이 되게 희석하였다. 희석된 ABTS·⁺ 용액 150 μ l와 CG 추출물을 각각 5 μ l 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

4) 세포 내 ROS 측정

Raw 264.7 세포에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 12 well plate에 Raw 264.7 세포를 2×10⁵ cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 CG를 각각 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도와 LPS 1 μ g/ml의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 DCF-DA로 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

7. 항염증 효능 측정

1) Nitric oxide(NO) 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitric oxide 농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후 새로운 배양액으로 교체하였고 CG를 각각 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도와 LPS 1 μ g/ml의 농도를 처리하여

다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer와 N2 buffer를 각각 10분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

2) Cytokine 생성량 측정

Raw 264.7 cells을 12 well plates에 2×10⁵ cells/ml이 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, CG를 1, 10, 100 (μ g/ml)의 농도로 처리하고, LPS 1 μ g/ml을 처리하였다. 24 시간 동안 배양 한 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 custom-made 4-plex cytokine Milliplex panel을 이용하여 측정하였다.

8. 통계처리

실험 결과는 실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test 및 ANOVA test를 사용하여 통계처리 하였으며 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포 독성

RAW 264.7 세포의 세포 생존율을 측정한 결과, 대조군을 100.0±7.4%로 나타냈을 때, CG 투여군 1, 10, 100 (μ g/ml) 농도에서 100.6±5.3%, 99.4±7.8%, 96.6±5.0%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

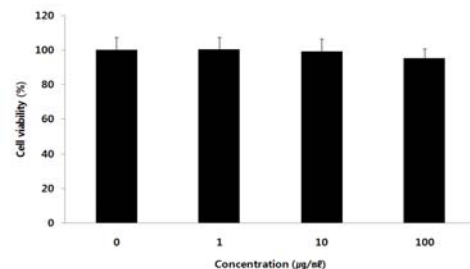


Fig. 1. Cell viability of CG extract in Raw 264.7 cells. Cells were treated with 1, 10, 100 (μ g/ml) of CG for 24 hours. Cell viability was determined using the WST assay. The results were expressed as mean \pm S.D.

2. 항산화효능에 미치는 영향

1) 총 폴리페놀 함량

CG 주정 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 함량을 gallic acid 를 표준물질로 하여 측정한 결과, Table II와 같이 총 폴리페놀 함량은 39.9 \pm 1.0 mg GAE (Gallic acid equivalent)/g의 수치를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Total phenolic contents of ethanol extract from CG.

Samples	Total phenolics (mg GAE ¹ /g ext.)
CG-ethanol ext.	39.9 \pm 1.0

¹⁾Total phenolic contents was expressed as milligram of gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract.

2) 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) radical 소거능에 미치는 영향

CG 주정 추출물의 DPPH 소거율은 1, 10, 100, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $5.6 \pm 0.4\%$, $11.8 \pm 2.4\%$, $43.6 \pm 4.9\%$, $86.0 \pm 3.8\%$ 로 나타나, 농도 의존적으로 증가함을 나타내었다(Fig. 2).

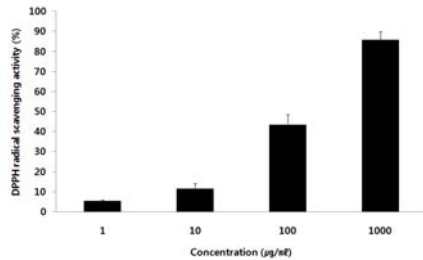


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of CG extract at various concentration. Extracts were incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517nm. The results were expressed as mean \pm S.D.

3) 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 소거능에 미치는 영향

CG 주정 추출물의 ABTS 소거율은 1, 10, 100, 1000 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $0.2 \pm 2.3\%$, $1.9 \pm 2.4\%$, $31.8 \pm 1.5\%$, $87.7 \pm 3.7\%$ 로 나타나, 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가함을 나타내었다(Fig. 3).

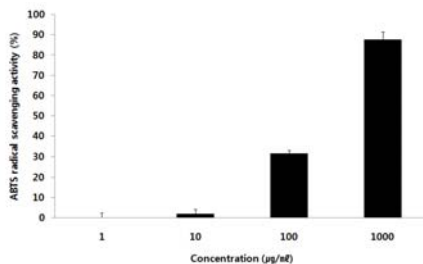


Fig. 3. ABTS free radical scavenging activity of CG extract at various concentration. Extracts were incubated with ABTS solution at RT for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D

4) ROS 생성 저해 활성에 미치는 영향

CG 주정 추출물의 ROS 생성 저해 활성은 대조군을 $100.0 \pm 0.3\%$ 로 나타냈을 때, 정상군은 $42.1 \pm 3.7\%$, CG 투여군은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $74.2 \pm 3.9\%$, $72.4 \pm 2.2\%$, $63.1 \pm 5.2\%$ 로, 대조군에 비해 농도 의존적이며 유의성 있는 ($*** p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

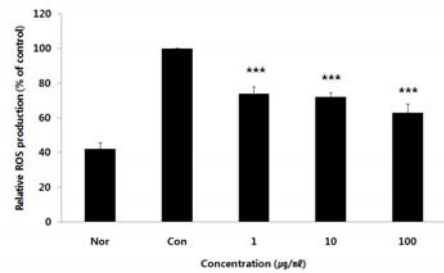


Fig. 4. Effects of CG extract on the ROS production in Raw 264.7 cells. The Raw 264.7 cells were stimulated with LPS and treated with medium, CG (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. The ROS production was analysed following incubation with DCFH-DA by flow cytometry. The results are expressed as mean \pm S,D (Significance of results, $*** p < 0.001$).

3. 항염증 효능에 미치는 영향

1) Total Nitric oxide(NO) 생성에 미치는 영향

CG 주정 추출물의 NO 생성량은 대조군을 $100 \pm 5.2\%$ 로 나타냈을 때, 정상군은 $5.8 \pm 2.2\%$, CG 투여군은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $87.0 \pm 7.2\%$, $87.8 \pm 6.1\%$, $45.2 \pm 4.5\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 ($*** p < 0.001$) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

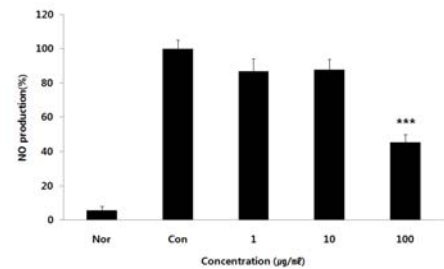


Fig. 5. Effects of CG extract on NO production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of CG for 24 hours. The results are expressed as mean \pm S,D (Significance of results, $*** p < 0.001$).

2) IL-1 β 생성에 미치는 영향

CG 주정 추출물의 IL-1 β 생성량을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 6.9\%$ 로 나타냈을 때, 정상군이 $10.3 \pm 11.0\%$, CG 투여군은 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 $94.8 \pm 7.2\%$, $82.7 \pm 7.8\%$, $48.8 \pm 0.2\%$ 로 대조군에 비해 농도 의존적인 감소를 나타내었고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 ($*** : p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6).

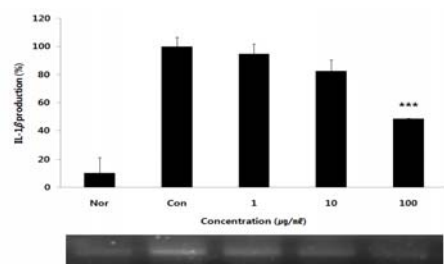


Fig. 6. Effects of CG extract on LPS-stimulated IL-1 β production in Raw 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of CG extract for 24 hours. The results are expressed as mean \pm S,D (Significance of results, $*** p < 0.001$).

3) IL-6 생성에 미치는 영향

CG 주정 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100.0 ± 6.0%로 나타냈을 때, 정상군이 3.4 ± 0.8%, CG 투여군은 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 36.6 ± 3.0%, 30.1 ± 2.1%, 22.3 ± 4.9%로 대조군에 비해 농도 의존적이며 유의성 있는 (***) : p < 0.001) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7).

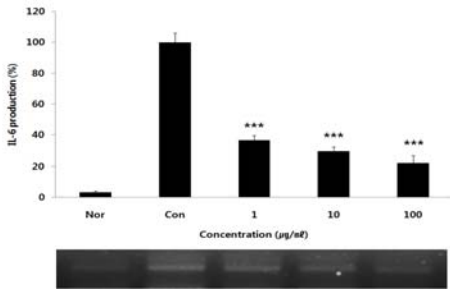


Fig. 7. Effects of CG extract on LPS-stimulated IL-6 production in Raw 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 µg/ml) and 1, 10, 100 (µg/ml) of CG extract for 24 hours. The results are expressed as mean ± S.D(Significance of results, *** p < 0.001).

4) TNF-α 생성에 미치는 영향

CG 주정 추출물의 TNF-α 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100.0 ± 1.0%로 나타냈을 때, 정상군이 16.3 ± 0.3%, CG 투여군은 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 91.2 ± 1.0%, 79.8 ± 2.0%, 65.2 ± 8.4%로 대조군에 비해 농도 의존적인 감소를 나타내었고, 100 µg/ml 농도에서 유의성 (*) : p < 0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).

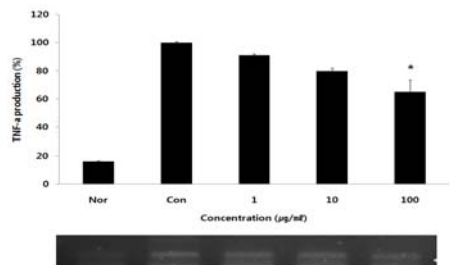


Fig. 8. Effects of CG extract on LPS-stimulated TNF-α production in Raw 264.7 cells. Cells were treated with LPS (1 µg/ml) and 1, 10, 100 (µg/ml) of CG extract for 24 hours. The results are expressed as mean ± S.D (Significance of results, * p < 0.05).

고찰

활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 초과산화이온 (superoxide anion radical : ·O₂⁻), 과산화수소 (hydrogen peroxide : H₂O₂), 수산화라디칼 (hydroxyl radical : ·OH)등이 있고, 불안정하며 반응성이 높아 주위의 화합물과 전자를 잃거나 얻으려는 특성이 있다. 또한 체내 여러 생체물질들과 쉽게 반응하여 세포 생체막을 구성하는 성분인 불포화지방산에 영향을 주는데, 이때 과산화반응이 일어나면서 체내에 과산화지질을 축적하게 된다. 이로 인해 생체 기능이 저하되어 암, 동맥경화, 염증, 당뇨, 노화 및 순환기 장애 등과 같은 여러 질환을 일으키는 원인이 된다^{12,13}.

활성 질소종 (reactive nitrogen species, RNS)은 일산화

질소 (nitric oxide : NO), 이산화질소 (nitrogen dioxide : NO₂), 아질산 (nitrous acid : HNO₂), 퍼옥시니트리트 (peroxynitrite : ONOO-)과 같은 물질이며, 대식세포, 호중구 및 다른 면역세포들의 면역반응으로 다량 생성되고, 또한 활성 산소도 같이 생성 된다¹⁴.

산화적 스트레스는 세포가 활성 산소에 노출되었을 때 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathionine peroxidase와 같은 항산화효소를 활성화 시켜 세포 내 산화적 스트레스를 제거하려는 방어적 역할을 하기도 한다¹⁵, 그러나 과도하게 생성된 활성 산소로 부터의 손상을 막기 위해서는 항산화제의 도움이 필요하다. 이에 최근 천연 물질을 이용한 항산화제에 대한 연구와 개발이 활발히 이루어지고 있고, 항산화 효능을 가진 물질들이 뛰어난 항염증 작용을 수반하고 있다고 보고 된바가 있으며¹⁶, 한의학적인 측면에서도 많은 연구발표가 이루어지고 있다¹⁷. 본 실험에 앞서 CG의 Raw 264.7 세포에 대한 생존율을 관찰 한 결과, 모든 농도에서 96% 이상의 세포 생존율을 나타내어 안전성이 검증되었다. 페놀성 화합물들은 연쇄반응 과정에서 alkyl radical이나 alkylperoxy radical에 수소를 공여하여 radical을 제거시킴으로써 산화를 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁸. 즉, 폴리페놀의 주성분인 flavonoid, tannins 등의 총량인 총 페놀 함량은 항산화 활성에서는 중요한 인자로 작용하며, 총 페놀 함량이 증가함에 따라 산화억제 작용이 활발히 이루어 진다는 것을 알 수 있다. 본 실험에서 gallic acid를 표준물질로 하여 CG 주정 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과, 39.87 mg/g 으로 나타났다. DPPH는 강한 산화력을 가진 유리 라디칼계 시약으로, DPPH에 의한 항산화 활성은 화합물이 DPPH radical에 전자를 공여함으로써 전자공여체인 항산화제와 만나 전자를 얻어 환원이 되면서 자유기를 소거하는 활성이다¹⁹. ABTS radical을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 pH에 민감하게 반응하는 DPPH 실험에 비해 비교적 넓은 범위의 pH에 적용될 수 있는 항산화 측정 방법이다^{19,20}. 본 실험에서 DPPH radical과 ABTS radical 소거 효능은 모두 농도 의존적으로 증가함을 나타내 유의적인 항산화능을 확인 할 수 있었다.

활성 산소(reactive oxygen species, ROS)는 원자나 분자가 안정적인 상태로 유지하기 하기 위해 주위에 맴도는 전자와 짝을 이루고, 짝을 이루지 못한 전자는 다른 세포를 파괴하여 안정적인 상태로 환원을 하려는 활성상태가 발생하게 되는데, 이런 활성이 강한 상태에 있는 물질들인 유리기 중 하나이다. 유리기가 생성이 되는 원인들로는 식물을 섭취하여 에너지로 전환 시키기 위해 산화와 환원이 이루어지는 과정, 운동으로 인한 산소 섭취량의 증가, 고강도 운동 또는 무산소 운동으로 인한 산소 공급이 적은 경우, 운동중에 받은 충격이나 생화학적인 반응으로 야기되는 근육의 손상으로 인해 생기는 염증반응, 대사증가와 호르몬 분비증가 등으로 알려져 있다^{21,22}. 본 실험에서 ROS 생성 저해능을 측정한 결과, 모든 농도에서 유의적인 결과를 나타내었다. 선행 연구에서 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 클수록 높은 항산화 활성을 나타내고, 폴리페놀을 함유한 천연물은 질병과 노화의 원

인이 되는 ROS와 RNS의 감소와 연관이 있다고 알려져 있고²³⁾, ROS는 생성 후 적절하게 제거되지 않아 체내에 축적이 되면 단백질이나 지질 등의 손상을 야기하고, 활성 산소에 의한 지질과산화물 생성으로 인해 세포가 파괴되어 각종 기능 장애를 일으킨다. 이러한 활성 산소종이 정상적 소멸 하지 않고 잔존하면 자유 라디칼에 의해 산화적 스트레스를 받게 됨으로 각종 질병의 원인이 된다고 알려져 있다²⁴⁾. 이에 본 연구 결과에서도 CG 투여군에서 자유 라디칼 감소능과 ROS 생성 억제능이 서로 부합되어 나타나, 항산화에 대한 효능이 있음을 뒷받침 할 수 있다.

염증 반응에 있어서 항산화작용을 연구는 중요하다. 과생산 되어 조절이 불가능한 reactive oxygen species(ROS)는 정상적인 세포에 산화적 스트레스로 작용한다. 이러한 ROS는 일차적으로 산화적 스트레스 뿐만 아니라 염증과 관련된 nitric oxide(NO), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 염증성 cytokine을 자극하여 과발현한다고 알려져 있어, 항산화와 항염증은 상호 연관되어 있다고 할 수 있다²⁵⁾.

그람-음성균의 세포 외막에 존재하는 lipopolysaccharide(LPS)는 대표적인 내독소 중의 하나로서, Raw 264.7과 같은 macrophage와 monocyte에서 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 염증성 cytokine의 분비를 촉진하며 iNOS의 발현을 유도하여 NO를 생성한다고 알려져 있다. NO는 인체에서 다양한 생리활성을 나타내는 인자이기도 하지만 과다 생산되면 활성 산소와 결합하여, 과산화 질소 등의 다른 독성 유리기 물질을 만들어 내어 염증질환을 유발시키거나 악화시키는 인자로 작용한다^{26,27)}. 이에 NO 소거능을 관찰 한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서만 유의적인 감소를 나타내었다.

IL-1 β 는 외부 항원을 감지한 대식세포에서 분비하는 비특이 염증반응을 개시하는 초기 면역반응 물질로써 LPS나 TNF- α 와 같은 다른 사이토카인에 의해 유도가 되며, 대식세포, 호중구 등에 의해 생산이 되는 염증 유발 사이토카인이다. 이런 IL-1 β 가 과도하게 생성되면 감염성 질환이나 자가면역질환 등을 유발한다²⁸⁾. 본 실험에서 IL-1 β 분비량 억제능은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서만 유의적인 감소를 나타내었다.

IL-6는 염증반응 시 분비되는 친염증성 사이토카인으로 단핵구나 대식세포에서 분비되며 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로, 염증성 병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서 IL-6 분비량 억제능은 모든 농도에서 유의적인 감소를 나타내었다.

TNF- α 는 T cell과 대식세포를 활성화하고 다른 pro-inflammatory cytokine들을 증가시켜서 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다. 주로 활성화된 대식세포에서 대량 생산되지만, 림프oid계의 세포(lymphoid cells), 비만세포(mast cells), 내피세포(endothelial cells)을 비롯하여 생체에 존재하는 다양한 세포에서도 생산된다. 또한, 면역세포들의 집합과 면역 매개 물질들의 생산을 자극하는데 중요한 역할을 담당하며, 인체 내의 미생물들을 포식하는 대식세포의 능력을 증진시키고 육아종(granuloma)을 형성하는 등, 숙주의 방어 기전에 있어서도 핵심적인 역할을 수행한다²⁹⁾. 본 실험에서 TNF- α 분비량 억제능은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서만 유의적인 감소를 나타내었다. 선행연구에서는 염증반응이 시작

이 되면 산화적 스트레스, lymphotoxin, LPS 등의 자극을 받아 NF- κB 염증인자가 활성화 되어 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 포함하는 주요 염증촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하며, COX-2, iNOS의 활성화를 조절하여 염증반응 전반에 걸쳐 중요한 역할을 한다고 보고 된 바 있고³⁰⁾, 이에 본 연구에서 CG 투여군이 사이토카인 생성 억제와 NO의 생성 저해 활성에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 상호 부합되는 결과가 나타나, 항염증에 대한 효능이 실험적으로 일부 입증 되었다고 판단된다.

결론

본 연구는 CG의 산화적 손상 및 염증에 미치는 효능을 객관적으로 검증하기 위해 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CG의 세포 독성평가에서는 97% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.
2. CG의 총 폴리페놀 함량이 39.87 mg/g 로 나타났고, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능과 ROS 생성 억제능을 통한 항산화 효능 평가에서 농도 의존적인 감소와 더불어 유의적인 결과가 도출되었다.
3. CG의 항염증 효능은 NO 생성 저해능과 IL-1 β , IL-6, TNF- α 소거능에서 모두 농도 의존적인 감소와 유의적인 결과가 도출되었다.

이상의 실험에서 CG의 항산화, 항염증 효능이 농도 의존적이고 유의한 결과가 도출되어, CG가 산화적 손상 및 염증에 대한 효과가 있음을 실험적으로 입증되었다. 항 후 개별 약물간 또는 원방인 천궁다조산과의 효능 비교 연구에서 iNOS 발현 또는 peroxynitrite 생성에 대한 영향 등의 실험을 추가하여 심도 있는 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성 면역 질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

References

1. Kim HH, The Study on Verification of Cosmeceutical Activities from Aster glehni Fr. Schm. and Application of oleosome on Advanced formulation, Daegu Haany University, 2010.
2. Fubini B, Hubbard A, Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis, Free Radic Biol Med, 2003 ; 34(12) : 1507-16.

3. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 2002 ; 18(10) : 872-9.
4. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation : Gearing the journey to cancer. *Mutat Res*. 2008 ; 659(1-2) : 15-30.
5. Nishida T, Yabe Y, Fu HY, Hayashi Y, Asahi K, Eguchi H, Tsuji S, Tsujii M, Hayashi N, Kawano S. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF- κ B. *Dig Dis Sci*. 2007 ; 52(8) : 1890-6.
6. Chen SW. Tai ping hui min he ji ju fang, Ren min wei sheng chu ban she. 1985 : 39-40.
7. Wei YL, Shi yi de xiao fang, Yi sheng tang. 1990 : 330-31.
8. Chun SH. Experimental study on the effects of ChunGoongDazo-san on blood pressure and hyperlipidemia. Kyung Hee University. 1997.
9. Joo SK. Analgesic effect of Cheongungdajosan extract and its action mechanism, Dongguk University. 2002.
10. Lee SJ, Shin JH, Lee HJ, Tak HM, Kang MJ, Sung NJ. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Functional Plant Materials. *J Life Sci*. 2013 ; 23(7) : 869-78.
11. Hong SC, Jun JA, Kim DH. Comparative Study of Antioxidant abilities on *Prunus yedoensis* and *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2013 ; 27(4) : 391-9.
12. Chawla A, Nguyen KD, Goh YPS. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 ; 11(11) : 738-49.
13. Kramer JH, Mak IT, Weglicki WB. Differential sensitivity of canine cardiac sarcolemmal and microsomal enzymes to inhibition by free radical-induced lipid peroxidation. *Circ Res*. 1984 ; 55 : 120-4.
14. Brüne B, Zhou J, A Von Knethen. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney Int Suppl*. 2003 ; (84) : S22-4.
15. Martinez GR, Loureiro APM, Marques SA, Miyamoto S, Yamaguchi LP, Onuki J, Almeida EA, Garcia CCM, Medeiros MHG, Mascio PD. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res*. 2003 ; 544(2-3) : 115-27.
16. Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Kim BW, Park SD. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of *Melia Toosendan* in Mouse Macrophage Cells. *Korean J Herbology*. 2008 ; 23(4) : 121-34.
17. Lee HS, Chung SJ, Kang ST. Natural Antioxidants for Foods, Seoul National University of Technology. 1997 ; 45(1) : 283-93.
18. Lee YS, Joo EY, Kim NW. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of *Lepista nuda*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006 ; 35(10) : 1309-14.
19. Park SY. Antioxidant activity of common fruits and vegetables. collection of dissertations-Journal editorial board. 2006 ; 29 : 59-67.
20. Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. ABTS Radical Scavenging and Anti-Tumor Effects of *Tricholoma matsutake* Sing. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2009 ; 38(5) : 555-60.
21. Jang JB, Park OR, Yun TE. Review : Free Radicals, Physical Performance, Aging and Antioxidants. *Korean J Ideal Body Meridian Pathways*. 2010 ; 2(1) : 19-27.
22. Ryu HS, Roh HT. Effects of High Intensity Exercise on Inflammatory Responses in Athletes and Healthy. *Off J Korean assoc certified Exerc Professionals*. 2011 ; 13(3) : 53-62.
23. Choo BK, Chung KH, Seo YB, Roh SS. Antioxidant, Antiinflammation and Hepatoprotective activity of *Schizandrae Fructus* processed with differentiated steaming number. *Korean J Herbology*. 2013 ; 28(2) : 83-92.
24. Choi CY, Degrandi IH, Cho SH. Antioxidant Effect of *Assai Palm Methanolic Extract*. *Korean J Food Preservation*. 2011 ; 18(6) : 967-72.
25. Park HG, Cha MR, Hwang JH, Kim JY, Park MS, Choi SU, Park HR, Hwang YI. Antimicrobial Activity of the Extract from *Pyrola japonica* against *Bacillus subtilis*. *J Life Sci*. 2006 ; 16(6) : 989-93.
26. Choi WH, Oh YS, Ahn JY, Kim SR, Ha TY. Antioxidative and Protective Effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* Extracts on Glutamate-Induced Cytotoxicity in PC 12 Cells. *Korean Soc Food Sci Technol*. 2005 ; 37(3) : 479-83.
27. Jung HM, Han HS, Lee YJ. Effect of Fermented *Epimedium Herba* Extract on the Cytotoxicity and Immuno modulating Activity. *Korean J Herbology*. 2013 ; 28(6) : 111-17.
28. Ryu IH, Cho HB, Kim SB, Seo YJ, Choi CM. The Inhibitory Effect of *Picrasmae Lignum* on Inflammatory Responses. *J Orient Gynecol*. 2011 ; 24(1) : 1-14.
29. Kim DH, Hwang EY, Son JH. Anti-Inflammatory Activity of *Carthamus tinctorious* Seed Extracts in Raw 264.7 cells. *J Life Sci*. 2013 ; 23(1) : 55-62.
30. Cheon YP, Mohammad LM, Park CH, Hong JH, Lee GD, Song JC, Kim KS. *Bulnesia Sarmienti* Aqueous Extract Inhibits Inflammation in LPS-Stimulated RAW 264,7 Cells. *J Life Sci*. 2009 ; 19(4) : 479-85.