

혈관내피세포에서 牛蒡子 에탄올 추출물의 항염증 효과

¹원광대학교 한의과대학 생리학교실, ²원광대학교 한의학전문대학원 천연물개발학,
³원광대학교 한방심신증후군센터
이윤정^{1,2,3}, 윤정주^{1,2,3}, 김혜음^{1,2,3}, 안유미^{1,2,3}, 홍미현^{1,3},
손찬옥^{1,2,3}, 나세원^{1,2,3}, 이호섭^{1,2,3}, 강대길^{1,2,3}

ABSTRACT

Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract from the Seeds of *Arctium lappa* L. in Vascular Endothelial Cells

Yun-Jung Lee^{1,2,3}, Jung-Joo Yoon^{1,2,3}, Hye-Yoom Kim^{1,2,3},
You-Mee Ahn^{1,2,3}, Mi-Hyeon Hong^{1,3}, Chan-Ok Son^{1,2,3},
Se-Won Na^{1,2,3}, Ho-Sub Lee^{1,2,3}, Dae-Gill Kang^{1,2,3}

¹Dept. of Physiology, College of Korean Medicine, Wonkwang University
²Dept. of Herbal Resources, Professional Graduate School of Korean Medicine,
Wonkwang University
³Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Wonkwang University

Objectives: The seeds from *Arctium lappa* have been considered for its various pharmacological properties, which include anti-carcinogenic, anti-inflammatory, anti-diabetic, and anti-viral activities.

Methods: In the present study, we investigated the anti-inflammatory effect of the ethanol extract from the seeds of *Arctium lappa* L (EAL) on cytokine-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Results: Pretreatment with EAL significantly decreased tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-induced cell adhesion molecules expression such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and endothelial-selectin (E-selectin) in a dose-dependent manner. Cell adhesion assay showed that pretreatment with EAL suppressed HUVEC-monocyte adhesion by TNF- α over 1 μ g/ml concentration. We investigated the involvement of nuclear transcription factor kappa-B (NF- κ B) in TNF- α -induced vascular inflammation. NF- κ B p65 nuclear expression was induced by TNF- α , however, pretreatment with EAL was attenuated that nuclear translocation. In cytoplasm, EAL was also attenuated TNF- α -induced decrease of inhibitor of κ B- α (I κ B- α) expression. Moreover, EAL significantly decreased TNF- α -induced production of intracellular reactive oxygen species (ROS).

Conclusions: Taken together, our findings suggest that seeds of *Arctium lappa* L could be a therapeutic herb for prevention of cardiovascular diseases throughout the inhibition of vascular endothelial inflammation.

Key Words: *Arctium lappa* L, Vascular Inflammation, Cardiovascular Diseases, Cell Adhesion Molecules, NF- κ B

I. 서 론

최근 영양과잉 및 운동부족, 스트레스 등으로 발생하는 고혈압, 고지혈증, 당뇨병과 같은 현대 만성질환은 죽상동맥경화증을 일으키는 주요 위험인자로, 이들 질환의 증가로 인하여 유발되는 심혈관 질환으로 사망률이 증가하면서 사회적 문제로 관심이 증가하고 있다¹⁾. 특히 여성의 경우 폐경 이후 심혈관질환 유병률이 높아지면서 이에 따른 예방 대책이 요구되고 있다. 혈관 내피세포에서 일어나는 대표적인 염증성 질환인 죽상경화증은 싸이토카인의 생성으로 시작될 수 있으며, 혈관부착인자의 발현을 촉진함으로써 죽상동맥경화증의 병변 부위에서 존재하는 대식세포의 활성을 자극하게 된다^{2,3)}. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)는 매우 중요한 염증 싸이토카인이며 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), 그리고 endothelial-selectin (E-selectin)와 같은 혈관 부착 인자들(Cell adhesion molecules)의 발현을 증가시킨다⁴⁾. 싸이토카인 뿐만 아니라 혈관의 내막에 콜레스테롤이 침착되고, 평활근세포가 증식하면 죽종이 형성되는데 이는 혈관의 내강을 좁히고 혈전을 형성하며, 협심증, 심근경색, 심내막염, 부정맥 등의 심장질환을 비롯하여 뇌경색, 뇌출혈과 같은 뇌혈관질환, 그 외에도 신부전, 허혈성 사지질환과 같은 각종 혈관 합병증을 유발하기도 한다⁵⁾.

Nuclear factor-kappa B(NF- κ B)는 전형적으로 inhibitory kappa B(I κ B)에 의하여 억제되는 다양한 종류의 염증반응

조절 인자들의 발현을 증가시킴으로써 염증 반응에서 매우 중요한 역할을 수행한다⁶⁾. NF- κ B는 박테리아의 lipopolysaccharide (LPS) 외에도 reactive oxygen species, oxidized lipoproteins, TNF- α 나 IL-1과 같은 염증성 사이토카인들에 의하여 활성화된다⁷⁾. 또한 이렇게 활성화된 NF- κ B는 사이토카인, 케모카인, adhesion molecules, antiapoptotic genes과 같은 많은 유전자들의 전사를 조절한다. NF- κ B는 자극을 받지 않는 안정 시에는 I κ B- α 와 결합하여 불활성화 상태로 세포질에 존재하다가 TNF- α 와 같은 사이토카인의 자극을 받으면 인산화에 의해서 활성화되어 세포질에서 핵으로의 이동을 유도하게 된다. 따라서 NF- κ B 활성의 저해는 잠재적으로 혈관 염증 작용을 억제할 수 있다⁸⁻¹⁰⁾. 그러므로 이러한 심혈관계 질환과 여러 가지 합병증을 유발하는 혈관성 염증을 억제할 수 있는 안전하고 효과가 좋은 혈관성 염증 억제제를 천연물로부터 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있다.

이 중 우엉은 국내 전역에 서식하여 주변에서 흔히 볼 수 있고 재배가 수월하며 대량을 얻을 수 있는 장점을 가지고 있으며, 예로부터 식용으로 이용했으며, 한방에서는 해독, 진통, 해열, 이뇨, 진정, 항산화작용, 항염증작용, 항진균작용 등 다양한 약리작용으로 인해 약용으로도 다양하게 이용되어 왔다^{11,12)}. 우방자(*Arctium lappa* Linne, 牛蒡子)는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 풀인 우엉의 여문 씨를 말린 것으로, 《대한민국약전》에는 우방자를 “우엉의 잘 익은 열매”로 등재하고 있다. 성질은 평(平)하고, 맛은 맵고 독이 없다. 한방에서는 소산풍열(疏散風熱), 설편투진(宣肺

透疹), 해독인후(解毒利咽) 등 작용이 있다하여 감모(感冒), 인후종통(咽喉腫痛), 마진(麻疹) 등에 사용한다. 주요 성분은 Arctiin이며, 가수분해되면 Arctigenin이 되고 Arcttin이 3분자 결합하게 되면 Lappaol A~H가 생성된다. 이 외에 Isoarctigenin, Matairesinol, Diarctigenin, 지방유 25-30%, 비타민A, 비타민B₁, Gobostenin 등의 성분이 있다¹³⁾. 우방자에 대한 선행연구로는 돌연변이 유발 감소효과¹⁴⁾, acetaminophen에 유발된 간 손상에 대한 보호효과¹⁵⁾, 항알러지 작용¹⁶⁾, compound 48/80 유도 비만세포 활성화와 혈관 투과성 억제 효과¹⁷⁾ 등이 보고되어 있다. 또한 최근 고지방식이 유발 고지혈증 랫드에서 혈관 이완 개선 효과에 대한 보고¹⁸⁾가 있었으나 세포 수준에서 우방자에 대한 혈관 염증 억제 효과에 대한 보고는 없었다.

따라서 본 연구에서는 우방자 에탄올 추출물을 인간 태줄유래 혈관내피세포에 전처리한 후 혈관 염증 억제 효과를 검증하고자 하였다. 식용과 한방에서도 사용해왔던 우방자에 대한 혈관 보호 효능을 검증하고 다양한 기전연구에 도움을 주고 더 나아가 폐경기 이후 여성뿐만 아니라 많은 사람들에게 심혈관질환 예방 및 치료를 위한 기초 한의학적 자료를 제공하는 데 그 목적이 있다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

우방자(Herbarium voucher No. HBH071-01)는 전북 익산에서 구입하여 원광대학교 한의학전문대학원에서 정선하여 사용하였다. 우방자는 먼지 및 잡질을 제거하

고, 상온에서 잘 건조시킨 후 다음 과정에 사용되었다. 우방자 600 g은 10 L 에탄올에 담아 상온에서 일주일간 추출하고, Whatman No. 3 종이필터로 필터하였다. 그런 다음 rotary evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 농축시킨 후 동결 건조 하였다. 이렇게 하여 얻은 우방자 에탄올 추출물은 10.3 g이었으며, 실험에서 적절한 용매에 녹여 사용하였다.

2. 세포 배양

인간 태줄유래 혈관내피세포(HUVEC)는 American Type Culture Collection(ATCC)(CRL-2873; Manassas, VA, USA)에서 구입 하였으며, Human monocytic leukemia cell line(HL-60) 역시 ATCC(CCL-240)를 통하여 구입하여, 10%의 FBS가 포함되어 있는 RPMI 1640(Gibco, USA)에서 37°C, 5% CO₂의 농도 조건으로 배양 하였다.

3. 세포독성 측정

우방자의 세포독성 여부를 확인하기 위해 HUVEC을 이용하여 세포독성을 확인 하였다. HUVEC은 5×10³ cells/100 μl의 농도로 96 well plate에 분주한 다음 24시간 후에 새로운 배지로 씻어내었다. 우방자를 0.01-20 μg/ml 농도로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl의 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에 4시간 동안 반응 시킨 후 solubilization solution을 넣고 24시간 동안 배양한 후 ELISA reader(Infinite F200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용하여 wave length 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 효소면역측정법

HUVEC을 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주한 후 세포가 70% 정도 자라면 우방자를 30분 동안 전처리 하고, TNF- α 를 최종 농도 10 ng/ml이 되도록 가하여 24시간 더 배양하였다. 배양 후, 1% paraformaldehyde로 1시간 고정하고 1% BSA가 함유된 PBS를 well에 넣고 1시간 동안 상온에서 blocking 하였다. 각 well을 세척한 후 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin 1차 항체를 1% BSA가 함유된 PBS에 1:1000으로 희석하여 분주한 다음 4°C 온도에서 overnight 하였다. 반응 시킨 후 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 세포 배양 배지에 100 μ l TMB single solution(Life technology, Carlsbad, CA, USA)을 각 well에 추가한 다음 배지의 색이 파란색으로 변하면 100 μ l 1 N HCl를 넣어 반응을 중단하였다. 색이 노란색으로 변하게 되면 형광의 강도를 spectrofluorometer(Infinite F200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용하여 495 nm 파장에서 측정하였다.

5. 단백질 분리와 western blot 분석

우방자와 TNF- α 를 처리한 HUVEC을 PBS로 2회 세척하고, RIPA buffer로 세포를 용해하여 단백질을 추출하였다. 단백질 정량은 Bradford법을 이용하여 단백질의 동량을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 전기 영동하여 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. 비특이적 항체 결합을 방지하기 위하여 BSA가 함유된 용액에 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. Blocking된 membrane을 1:1000으로 희석한 각 타겟 단백질의 1차 항체를 처

리한 다음 1:2000으로 희석한 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시키고 ECL solution을 반응시켜 발현 정도를 chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 측정 후 정량 하였다.

6. 세포 부착율 측정

HUVEC과 monocyte 부착율을 측정하기 위하여 HUVEC을 6-well culture plate에 분주한 후, 세포가 약 70% 정도 자라면 serum free 배지로 교체한 다음 우방자를 각 농도별로 30분간 전처리 후 TNF- α 를 최종 농도 10 ng/ml이 되도록 가하여 24시간 배양하였다. HL-60 세포는 2.5×10^5 cells/ml로 분주하여 culture dish에서 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 배양한 후 10 μ M 2,7-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethylester (BCECF-AM, Sigma, USA)으로 1시간 동안 염색하였다. 혈관 내피 세포에 부착된 HL-60 세포는 fluorescence microscopy (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 측정된 후 0.1% SDS가 포함되어 있는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)를 이용하여 세포를 용해시켜 spectrofluorometer(F-2500, Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 485 nm과 535 nm의 파장으로 부착율을 측정하였다.

7. 핵과 세포질에서 단백질 분리

우방자와 TNF- α 이 처리된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 세포를 모은 후 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 이 세포에 buffer A [10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, NP-40]를 넣어 15초간 vortexing한 후

ice에서 15분간 두었다. 그 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포질의 단백질이 포함되어있는 상층액을 tube에 옮겨 -70°C에서 보관하고, pellet에 buffer B [20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, protease inhibitor cocktail]을 넣고 10초간 vortexing한 후 매 10분마다 3회 vortexing하였다. 그 후 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 핵 단백질 부분을 포함하는 그 상층액을 새로운 tube에 옮겨 -70°C에서 보관하였다.

8. 활성산소 측정

형광 염색 탐침자인 CM-H₂DCFDA (Invitrogen, Oregon, USA)를 사용하여 ROS의 생성 정도를 측정하였다. 60 mm² dish culture plates에 혈관 내피 세포를 배양하고, 70% 정도 자라게 되면 우방자를 30분 동안 전 처리하였다. 세포 배양액을 제거한 다음 TNF-α와 함께 20 μM CM-H₂DCFDA를 넣은 다음 1시간 동안 배양하였다. 생성된 활성산소는 형광의 강도에 대한 수치로 나타내었으며 spectrofluorometer (F-2500, Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 485 nm과 535 nm의 파장으로 활성산소의 생성 정도를 측정하였다.

9. 통계분석

결과의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로 표시하였으며, 실험 결과의 통계처리는 Systat의 SigmaPlot version 10.0을 사용하여 Student's t-test를 통하여 p 값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

III. 결 과

1. 혈관 내피세포에서 우방자의 세포독성에 대한 분석

우방자의 세포독성 범위를 확인하기 위하여 MTT assay 방법을 이용하여 세포독성을 확인하였다(Fig. 1). 우방자를 0.01, 0.1, 1, 10, 20 μg/ml의 농도로 각각 처리했을 때 10 μg/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다. 그러나 20 μg/ml의 농도로 처리했을 때 세포 생존율이 약 50% 정도로 감소하여 세포독성을 나타내었다(p<0.01). 따라서 이후 실험은 독성이 없는 0.01-10 μg/ml 농도 범위에서 수행하였다.

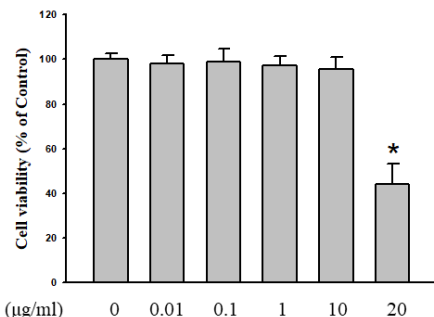


Fig. 1. Effects of EAL on cell viability in HUVEC.

(A) Cell viability was measured using the MTT assay. HUVEC were treated with various concentrations (0.01-20 μg/ml) of EAL for 24 h. Values are mean±SE of three individual experiments. *p<0.01 vs. control.

2. 우방자가 TNF-α에 의해 유도된 VCAM-1, ICAM-1, E-selectin 발현의 억제에 미치는 영향

혈관염증의 시작으로 알려진 세포부착 인자의 발현을 알아보기 위하여 ELISA 기법을 이용하여 우방자가 adhesion molecule의 발현을 억제시키는 지의 여부를 확인하였다. ICAM-1, VCAM-1, E-selectin의 발

현 증가는 TNF- α 를 처리하였을 때 각각 50% 이상이 증가되는 것을 확인하였다. 그러나 우방자를 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 전처리하였을 때 농도 의존적으로 TNF- α 단독 처리 군에 비하여 adhesion molecule의 발현률이 감소하는 결과를 확인하였다(Table 1). 이 결과를 바탕으로 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin 단백질 발현을 직접 확인하기 위하여 western blot

을 실시하였다. ELISA 기법의 결과와 마찬가지로 TNF- α 를 처리한 HUVEC에서 우방자에 의한 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin의 발현 억제 정도를 확인하였다(Fig. 2). Positive control로 강력한 항산화물질인 EGCG(Epigallocatechin Gallate)를 사용하였으며, EGCG 전처리에 의하여 TNF- α 에 의한 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin 발현 역시 억제하는 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of EAL on TNF- α -Induced HUVEC Surface Expression of Cell Adhesion Molecules

| Groups | ICAM-1 (%) | VCAM-1 (%) | E-selectin (%) |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| Control | 101.67 \pm 0.88 | 100 \pm 0.58 | 99.33 \pm 0.67 |
| TNF- α | 159.33 \pm 5.49* | 163.67 \pm 3.48* | 173.67 \pm 6.44* |
| TNF- α + EAL 0.1 $\mu\text{g/ml}$ | 147.33 \pm 4.26 | 159.33 \pm 4.10 | 158.33 \pm 4.26 |
| TNF- α + EAL 1 $\mu\text{g/ml}$ | 142.0 \pm 4.04† | 150.33 \pm 5.21 | 140.0 \pm 5.51† |
| TNF- α + EAL 10 $\mu\text{g/ml}$ | 124.67 \pm 2.60‡ | 122.33 \pm 6.39‡ | 110.67 \pm 6.64‡ |
| TNF- α + EGCG 50 μM | 112.45 \pm 1.85‡ | 117.85 \pm 3.36‡ | 115.37 \pm 2.47‡ |

HUVEC were pretreated with 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ EAL or 50 μM EGCG for 30 min and then stimulated with 10 ng/ml TNF- α for 24 h. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde and the cell surface expression of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin were analyzed by ELISA. Polyphenol such as EGCG was used as positive control. Values are mean \pm SE of three individual experiments. *P<0.01 vs. control, †P<0.05, ‡P<0.01 vs. TNF- α alone

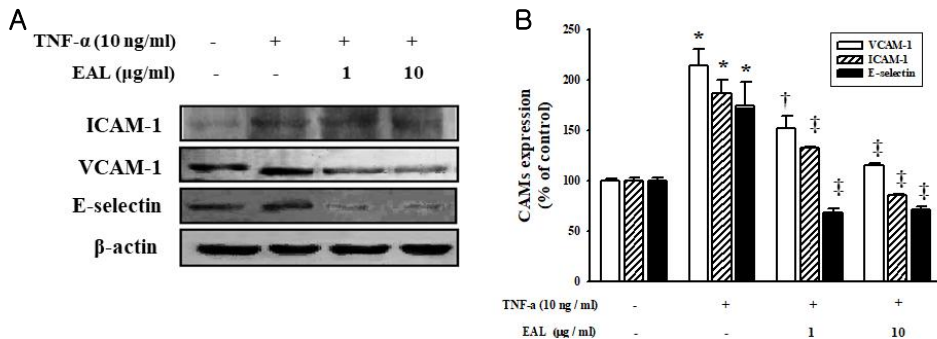


Fig. 2. Effect of HHT on TNF- α -induced expression of adhesion molecules and vascular inflammation.

(A) Western blot analysis of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin protein expression. (B) Densitometric quantification of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin. The blots are representative of five independent experiments. *P<0.01 vs. control, †P<0.05, ‡P<0.01 vs. TNF- α alone.

3. 우방자에 의한 혈관내피세포와 단핵구 세포 부착 억제효과

우방자에 의한 세포부착인자의 발현 감소를 확인하였으므로 혈관내피세포와 단핵구 세포와의 직접적인 부착여부를 알아보기 위하여 우방자를 세포에 30분 동안 처리해 준 다음 TNF- α 자극을 24시간 주고 BCECF-AM을 이용하여 HL-60세포를 HUVEC에 분주하여 배양하였다. 우방자를 0.1, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 전처

리하였으며, 50 μM EGCG 역시 전처리한 후 TNF- α 에 의하여 증가된 단핵백혈구의 세포 부착 정도를 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 3A). TNF- α 에 의하여 증가된 단핵백혈구의 세포 부착 정도가 우방자 전처리 시 농도 의존적으로 TNF- α 단독 처리 군에 비하여 감소하는 결과를 얻을 수 있었다. 이는 세포를 용해하여 형광정도를 측정 한 결과에서도 같은 경향을 나타내었다(Fig. 3B).

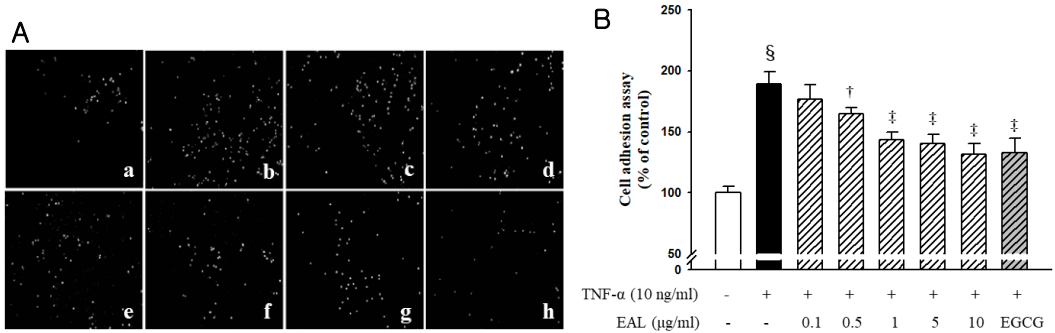


Fig. 3. Effect of EAL on adhesion of monocytes to TNF- α -stimulated vascular endothelial cells. HUVEC were pretreated with EAL and then stimulated with 10 ng/ml TNF- α . Fluorescence-labeled HL-60 monocytes adhesion (A). [a] Control, [b] TNF- α , [c] co-treated with TNF- α and 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EAL, [d] co-treated with TNF- α and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EAL, [e] co-treated with TNF- α and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EAL, [f] co-treated with TNF- α and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EAL, [g] co-treated with TNF- α and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EAL, [h] co-treated with TNF- α and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EAL. The numbers of adherent HL-60 cells were monitored by fluorescence microscopy (B). Values are the mean \pm SE of six independent experiments with triplicate dishes. [§]P<0.05 vs. control, [†]P<0.05, [‡]P<0.01 vs. TNF- α alone.

4. 우방자에 의한 NF- κ B의 발현 억제 효과

염증 반응을 조절하는 전사조절인자인 NF- κ B의 활성화와 p-I κ ba 분해에 대한 우방자의 영향을 알아보기 위해 핵과 세포질을 분리하여 단백질 수준에서 발현 변화를 비교하였다. 그 결과, TNF- α 자극에 의해 NF- κ B 핵 내 단백질 발현이 증가되었고, 세포질 내 I κ B-a의 발현은 감소하였다. 그러나 우방자 전처리에 의해 TNF- α 에 의한 NF- κ B 핵으로의 이동과

I κ B-a의 분해가 현저하게 억제되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 우방자가 TNF- α 로 유도된 NF- κ B 핵 내 이동을 억제함으로써 염증신호전달 경로인 NF- κ B 신호전달을 차단할 수 있음을 확인하였다.

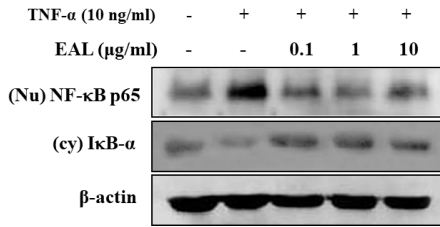


Fig. 4. Effects of EAL on TNF- α -induced NF- κ B signaling pathway.

HUVEC were pretreated with the indicated concentrations of EAL for 30 min and then stimulated with TNF- α for 1 h. The expression level of NF- κ B in the nucleus and I κ B- α in cytosol were determined by western blot analysis.

5. 우방자에 의한 활성산소 억제 효과

TNF- α 에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 우방자의 억제 효과를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 실험 결과 TNF- α 에 의해 증가된 ROS가 TNF- α 단독 처리군에 비하여 우방자의 농도 의존적으로 유의적인 감소 경향을 나타내었다. 특히 우방자를 10 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때는 positive control로 처리한 EGCG (50 μ M) 수준까지 감소하는 경향을 확인하였다. 따라서 우방자 처리로 혈관내피세포의 ROS 소거능을 증가시켜 세포 내 ROS가 효과적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

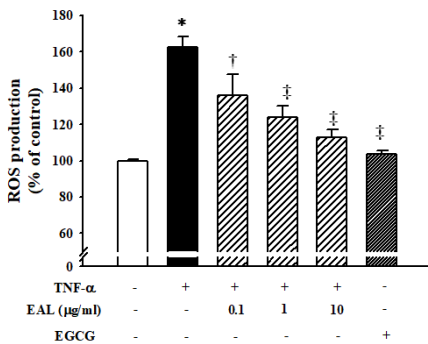


Fig. 5. Inhibitory effect of EAL on TNF- α -induced ROS production.

ROS production was expressed as mean $*P < 0.01$ vs. control, $†P < 0.05$, $‡P < 0.01$ vs. TNF- α alone

IV. 고찰

우방자는 식용과 약용으로 동시에 쓰이는 약재로 항산화작용, 항염증작용, 항진균작용 등 다양한 약리작용으로 인하여 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본에서도 많이 쓰이고 있다. 이에 본 연구는 인간 태줄유래 혈관내피세포에서 대표적인 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 에 의해 유도된 세포 부착인자 및 염증관련 전사인자인 NF- κ B 억제효과를 통하여 우방자 에탄올 추출물의 혈관염증 억제 효과 검증 및 그 기전에 대해 알아보았다.

먼저 우방자에 의한 혈관내피세포의 독성 및 세포 생존능력을 조사하여 세포보호 효과를 확인하였다. MTT assay를 통해 혈관내피세포의 독성을 확인한 결과 10 μ g/ml의 농도까지 세포 독성이 관찰되지 않았으나, 20 μ g/ml 농도에서 세포독성이 증가함을 보였다. 그러므로 우방자의 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 적절한 농도범위에서 실험을 수행하였으며 세포 독성을 통하여 혈관 염증 검증에 영향을 주지는 않는 것으로 나타났다.

혈관 염증은 혈관에 염증이 발생하여 혈관내경이 좁아지고 조직의 허혈 및 괴사를 초래하는 질환으로 크기, 위치 및 형태에 관계없이 모든 혈관을 침범하여 다양한 증상을 나타낸다고 보고되어 있다^{19,20}. 혈관염증의 초기 단계는 단핵구의 내피세포로의 부착으로 인해 단핵구와 세포 부착분자 간 상호 작용이 일어난다. ICAM-1, VCAM-1, E-selectin과 같은 세포부착분자는 단핵구의 부착을 중개하는데 이것은 특히 혈관이 많은 내피의 혈관손상에서 잘 발견된다. 사람 혈관 내피세포에서는 ICAM-1

이나 VCAM-1과 같은 세포에서 선택적으로 발현하는 다양한 세포부착분자를 통해서 단핵구와 결합한다^{21,22}). 본 연구에서는 TNF- α (10 ng/ml) 처리에 의하여 증가된 세포부착인자 단백질 ICAM-1, VCAM-1, 그리고 E-selectin의 발현이 우방자 전처리에 의해 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 세포 수준에서의 단백질 발현량을 측정하기 위해 western blot을 시행한 결과, TNF- α 를 단독 처리한 군에 비해 우방자를 전처리한 군에서 ICAM-1, VCAM-1, 그리고 E-selectin 단백질 발현이 이 유의성 있게 감소함을 보여주었다. 혈관내피세포와 단핵구 세포의 직접적인 부착정도를 알아본 결과, TNF- α 에 의한 세포부착이 현저하게 증가하였으며 이러한 부착정도가 우방자에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 이러한 실험 결과들로 보아 우방자가 TNF- α 로 유도된 VCAM-1, ICAM-1, 그리고 E-selectin의 발현을 조절함으로써 죽상경화증을 유발하는 혈관염증의 초기 단계를 억제하여 항염증 작용에 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

염증반응에 있어 중요한 전사인자 중 하나인 NF- κ B는 염증반응, 면역반응을 조절하고 세포의 증식 및 자연세포사(apoptosis)에 관여하며 160개 이상의 유전자들을 조절할 뿐 아니라, 수많은 인자들에 의해 NF- κ B의 활성이 유도된다^{23,24}). 또한 NF- κ B의 활성을 유도하는 인자뿐만 아니라 NF- κ B에 의해 조절되는 유전자들이 죽상동맥경화증에 직접 또는 간접적으로 관련이 있어 이에 대한 연구에 있어 매우 중요한 역할을 수행하는 전사 인자이다²⁵). NF- κ B는 정상적인 상태에서는 세포질에 p50, p65의 heterodimer와 저해제인 I κ B- α 와 함께 비

활성 상태로 존재하지만 염증성 자극을 받게 되면, I κ B- α 를 인산화 시키며 핵 내로 이동한 다음 전사 인자로서의 역할을 수행한다²⁶). 본 연구에서는 우방자가 염증 조절 인자인 NF- κ B의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 실험을 진행하였다. 그 결과, TNF- α 자극은 핵 내부에서의 NF- κ B 발현을 증가시켰고, 세포질에서의 I κ B- α 발현을 감소시켰으나, 우방자가 이를 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 우방자는 I κ B- α 의 인산화 억제를 통해 NF- κ B의 핵 내로 이동 및 활성을 조절하는 것으로 예상되며 NF- κ B의 활성화로 인한 여러 가지 염증성 단백질의 발현을 억제하여 염증 과정을 조절하는 것으로 사료된다.

산화적 스트레스는 혈관염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 죽상동맥경화증이 진행되는 데 있어서 매우 중요한 역할을 한다²⁷). ROS/NF- κ B 신호전달 경로는 혈관 질환에 대한 염증 반응에 있어서 매우 중요한 조절 인자라고 알려져 있다. 따라서 혈관 내피세포에서의 활성 산소 생성을 CM-H₂DCFDA 염색을 통하여 측정하였으며 면역형광 염색을 통하여 시각화 하여 관찰하였다. 그 결과 TNF- α 에 의하여 유도된 활성산소의 생성은 현저하게 증가하였으며 이를 우방자 추출물이 완화시켜주는 것을 확인할 수 있었다.

결과적으로, 이 실험에서는 TNF- α 로 유도된 인간 태줄유래 혈관내피세포 염증 반응에서 우방자 에탄올 추출물의 ICAM-1, VCAM-1, 그리고 E-selectin과 같은 CAMs 발현 및 NF- κ B 활성화에 대해 어떠한 영향을 미치는지 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 우방자는 TNF- α 로 유도

된 CAMs 발현과 p65 NF- κ B 활성을 저해함을 보였다. 특히 10 μ g/ml의 농도에서는 ICAM-1, VCAM-1, 그리고 E-selectin의 단백질 및 발현 모두 확실한 저해 효과를 나타내었으며 핵 내 NF- κ B 활성화와 ROS 생성 역시 현저하게 저해시키는 것을 알 수 있었다. 이런 결과들로 보아 우방자는 혈관 염증 및 혈관 합병증 예방 및 치료에 효과적일 수 있다고 사료된다. 특히 여성호르몬이 혈중 지질, 응고 인자, 혈관 평활근세포와 내피세포 등에 미치는 영향이 알려져 있으며 이의 결핍으로 인한 폐경이 죽상동맥경화 병변의 발전에 직·간접적으로 기여할 것이라는 사실이 보편적으로 인정되고 있는 가운데 식용이나 건강기능식품 또는 기타 다른 방식으로의 우방자 섭취는 임상에서 흔히 접할 수 있는 폐경기 여성의 심혈관계 질환 예방 및 치료에 효과적으로 활용 할 수 있을 것으로 판단된다.

염증 유발 매개 인자에 대한 유전자 발현 및 활성의 저해 방법은 다양한 염증성 질환을 예방하거나 억제할 수 있는 치료 원리 및 방법이 될 수 있다. 한약재와 같은 천연소재로부터 치료제를 발굴할 경우 부작용이 적고 안전성이 높기 때문에 좋은 개발 후보 물질이 되리라 예상된다. 따라서 본 연구를 통해 우방자가 혈관 염증 조절을 통해 심혈관계 질환 진행에 있어서 보호효과의 가능성을 알 수 있었으며, 향후 세부작용기전 및 임상적 효능을 위한 추가연구를 통해 부작용이 없는 심혈관계 질환 치료제 소재로 개발될 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

□ Received : Jul 17, 2019

□ Revised : Aug 01, 2019

□ Accepted : Aug 29, 2019

감사의 글

본 연구는 원광대학교 연구비지원(2018년)에 의해 수행되었음.

References

1. Lee AS, et al. Anti-TNF- α activity of *Portulaca oleracea* in vascular endothelial cells. *Int J Mol Sci*. 2012;13(5):5628-44.
2. Liu X, et al. Leonurine protects against tumor necrosis factor- α -mediated inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2012;222(1):34-42.
3. Rao RM, et al. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res*. 2007;101(3):234-47.
4. Sana TR, et al. Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine*. 2005;29(6):256-69.
5. Cho YM, et al. Suppression of VCAM-1 expression in human aortic smooth muscle cells treated with ethanol extracts of *Cynanchum wilfordii* radix, *Arctium lappa* L., and *Dioscorea opposita*. *Korean J Plant Res*. 2016;29(5):525-31.
6. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappa B puzzle. *Cell*. 2002;109(2):81-96.
7. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational

- mechanism. *Cell*. 1986;47(6):921-8.
8. Branen L, et al. Inhibition of Tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(11):2137-42.
 9. Noh JR, et al. Antiatherogenic effect of antioxidant polyphenols from *Phellinus baumii* in apolipoprotein E-deficient mice. *Ann Nutr Metab*. 2011;59(2-4):145-53.
 10. Ditiatkovski, et al. Inhibition of extracellular cyclophilins with cyclosporine analog and development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;353(3):490-5.
 11. Jun HJ, et al. The Effect of Cream Containing *Arctii fructus* Extracts on the Improvement of Facial Skin. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2014;12(6):885-90.
 12. Matsumoto T, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of but-yrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Med*. 2006;72(3):276-8.
 13. Hwang JY, et al. Anti-wrinkle Compounds Isolated from the Seeds of *Arctium lappa* L. *J Life Sci*. 2012;22(8):1092-8.
 14. Morita K, et al. A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). *Mutat Res*. 1984;129(1):25-31.
 15. Lin SC, et al. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced liver damage. *Am J Chin Med*. 2000;28(2):163-73.
 16. Nam JY, et al. Effects of woobangja on anti-allergic inflammation. *J Kor Ori Ped*. 2006;20(1):241-55.
 17. Kim EK, et al. Inhibitory effect of *Arctium lappa* linne on compound 48/80 induced mast cell activation and vascular permeabilty. *Kor J Phys Anthropol*. 2004; 17(1):55-66.
 18. Lee YJ, et al. *Arctium lappa* ameliorates endothelial dysfunction in rats fed with high fat/cholesterol diets. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:116.
 19. Cleman JE, et al. Effeicient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentivial vectors for use in vivo. *Physiol Genomics*. 2003;12(3):221-8.
 20. Iiyama K, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*. 1999;85(2):199-207.
 21. Harvey KA, et al. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *J Lipid Res*. 2010;51(12):3470-80.
 22. Perdomo L, et al. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:75.
 23. Liu Y, et al. Mycotoxin verrucarín A inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting prosurvival Akt/NF- κ B/mTOR signaling. *J Exp Ther Oncol*. 2016;11(4):251-60.
 24. Chan J, et al. TRAIL promotes VSMC proliferation and neointima formation

- in a FGF-2-, Sp1 phosphorylation-, and NFkappaB-dependent manner. *Circ Res.* 2010;106(6):1061-71.
25. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-74.
26. Brasier AR. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signaling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):211-8.
27. Tsai KL, et al. Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by anti-oxidant action and anti-inflammation capacity. *Oncotarget.* 2017;8(18):29600-12.