

DCFH-DA 를 이용한 항산화제의 세포내 oxidative stress 억제 효과에 관한 연구

The anti-oxidative stress effect of antioxidants in the cell using DCFH-DA

유영근, 신미희, 정민석, 최종완(한국화장품 기술 개발 연구소)

요약

본 연구는 널리 알려져 있는 항산화제들의 세포 수준에서의 anti-oxidative stress 효과 및 그 기작을 알아보기 위한 연구이다. 연구에 사용한 항산화제로는 지용성인 retinol, α -tocopherol, propyl gallate(PG) 및 butylated hydroxy toluene(BHT)과 수용성인 ascorbic acid, α -glucosyl rutin 및 green tea extract 를 사용하였으며 이들 항산화제들의 시간별 세포 생존율을 NR assay 로 측정된 후 적정 농도에서 DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate) 를 이용하여 항산화제들의 anti-oxidative stress 억제 효과를 시간별로 측정하였다. 또한 이들 항산화제의 항산화 기작을 알아보기 위하여 NBT(Nitro-blue-tetrazolium) 및 DPPH(Diphenyl-picryl-hydrazyl)도 병행하여 실시하였다.

Anti-oxidative stress 실험에서 지용성 항산화제들은 전반적으로 수용성 항산화제에 비하여 세포에 대한 독성이 상대적으로 강하여 retinol 의 경우에는 0.01%에서 oxidative stress 억제 효과를 관찰할 수 있었으며 1 시간경과 후 측정시 53.1%의 억제 효과를 보여 주었다. PG 의 경우에는 0.1%에서 2 시간 경과 후 측정시 50%의 oxidative stress 억제 효과를 보여주었다. 수용성 항산화제인 green tea extract 및 α -glucosyl rutin 의 경우에는 1%에서 1

시간 경과 후 측정시 각각 51.6% 및 69.7%의 oxidative stress 억제 효과를 관찰할 수 있었다. 또한 시료처리 후 자외선 조사시 oxidative stress 억제 효과의 경우 수용성 항산화제인 ascorbic acid, α -glucosyl rutin 및 green tea extract 와 지용성 항산화제 중에서는 δ -tocopherol 에서만 oxidative stress 억제 효과가 관찰되었으나 자외선을 조사 하지 않았을 때 보다 약 20%-40%까지 억제 효과가 감소되었다. 그리고 PG 및 retinol 의 경우에는 자외선 조사시 독성이 증가하여 oxidative stress 억제 효과를 측정할 수 없었다.

NBT 실험에서 α -glucosyl rutin, α -tocopherol 및 PG 1%에서 70%이상의 superoxide anion 생성 억제 효과를 보였으며 DPPH 실험에서는 ascorbic acid 와 PG 1%에서 98%의 hydroxyl radical 생성 억제 효과를 보여 주었다.

본 실험을 통하여 BHT 를 제외하고 전반적으로 세포 수준에서의 oxidative stress 에 대한 억제 효과를 확인해 볼 수 있었으며 특히 수용성 항산화제들에서 두드러진 효과를 보여 주었다.

1. 서론

인간의 세포는 끊임없이 hydroxyl 이나 peroxy radical 또는 superoxide 와 같은 활성산소에 노출되어 있다. 이와 같은 활성산소들의 대부분은 세포 내에서 형성되며 그 기원은 담배의 흡연, 오염된 공기의 흡입 그리고 자외선의 영향에 의한 것이다. 만성적으로 활성산소에 노출될 경우 유전인자의 손상, 세포막의 파괴, 인단백질 그리고 기능 및 구조 단백질의 변형을 가져오게 된다. 따라서 활성산소가 피부노화를 일으키는 주원인임은 잘 알려진 사실이다(1). 세포 내에서 활성산소에 대한 방어체계로써 superoxide dismutase 와 같은 내재적인 항산화 효소가 존재하지만 충분한 방어가 이루어지지 못하기 때문에 외부 항산화제의 공급이 필요하다(2).

정상적인 상태의 세포 내에서 활성산소는 내재적인 항산화제를 이용하여 세포의 redox system 을 조절함으로써 세포의 항상성을 유지시키는 데 관여한다. 그러나 때때로 자외선

에 의해 과량의 활성산소가 형성되고 세포내의 축적된 항산화제로 이를 중화시키지 못하게 되면 세포내외의 성분들이 화학적 변성 및 물리적 변형을 겪게 된다. 동시에 세포의 성장 및 분화 그리고 노화를 일으키는 신호전달체계가 활성산소에 의해 활성화된다(3). 이에 따라 피부의 활성산소 방어능력을 향상시켜 줄 수 있는 항산화제의 검색에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 또한 이들 활성성분에 대한 oxidative stress 억제효능 평가법에 관한 관심이 증가되고 있다.

α -tocopherol 에 대한 항산화 효과는 오래 전부터 알려져 왔으며 ascorbic acid 및 retinol 에 대한 세포 내 항산화 효과도 최근에 잘 알려지게 되었다(3,4). 최근에는 식물추출물의 항산화 효과가 자주 보고 되면서 이들 식물추출물의 oxidative stress 억제효과에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 특히 녹차추출물이 대표적인 항산화 효과를 가지고 있는 식물추출물로서 널리 알려져 있다. 또한 식물추출 성분 중 flavonoid 류의 항산화 효과도 관심이 증가되고 있다(5). Propyl gallate(PG) 및 butylated hydroxyl toluene(BHT)은 EDTA 와 함께 유화제품의 안정화제로 이용되고 있으며 이들은 또한 phenolic antioxidant 로 BHT 의 경우에는 superoxide anion 생성 억제효과를 PG 의 경우에는 peroxy radical 의 생성 억제효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(6,7).

노화방지에 있어 세포를 oxidative stress 로부터 보호하는 과정이 필수적이며 따라서 피부노화에 있어 세포내부에서 발생하는 만성적인 활성산소 노출과정을 감소시키는 접근법이 필요하다(3).

항산화제의 활성을 평가하는 실험법은 다양하다. 예를들어 NBT 및 DPPH 가 대표적인 항산화제의 활성을 측정하는 방법들이다(8,9). 그러나 세포 내의 형성된 활성산소의 양을 측정할 수 있는 실험법이 요구되었으며 이에 따라 여러가지 평가법이 개발되었다. DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate)를 이용한 fluorimetric assay 가 대표적인 평가법으로 DCFH-DA 는 비극성분자로 용이하게 세포 내로 들어갈 수 있으며 세포 내의 esterase 에 의해 비형광성 극성분자인 DCFH 으로 분리된 후 세포 내의 활성산소에 의해 산화되면 형광성 DCF(2',7'-dichlorofluorescein)로 전환되게 되고 이를 fluorometer 로 측정하는 방법이다

(10,11). 최근에 이를 이용하여 세포 내 활성산소를 정량화하고 있으며 본 연구도 DCFH-DA 를 이용하여 항산화제에 대한 세포수준에서의 oxidative stress 억제효과를 측정하였다. 또한 NBT 및 DPPH 를 이용하여 각 항산화제의 화학적인 측면에서의 항산화력을 측정하여 세포내의 oxidative stress 억제기작을 조사하였다.

2. 실험 및 재료

1) Cytotoxicity

항산화제 중 수용성 항산화제로는 ascorbic acid, α -glucosyl rutin 및 green tea extract 를 이용하였으며 지용성 항산화제로는 retinol, α -tocopherol, propyl gallate(PG) 및 butylated hydroxy toluene(BHT)을 이용하였다. 그리고 α -glucosyl rutin(Hayashibara Biochemical Laboratories Lnc.) 및 green tea extract(Bioland, Ltd)을 제외하고는 모두 sigma 에서 구입하였다. 지용성인 retinol, α -tocopherol, PG 및 BHT 는 DMSO(dimethyl sulfoxide, sigma)로 용해 후 실험시에는 최종 농도가 1%이하가 되도록 처리하였다(12). Trypsinization 에 의해 회수한 transformed mouse fibroblast L929 를 5% BCS 가 함유된 DMEM· F'10 배지로 현탁시킨 후 96 well tissue culture plate 각각의 well 에 세포현탁액(5000-10000cells/well) 100 μ l 를 접종한 다음, 37°C 에서 5% CO₂ 조건으로 24 시간 배양하였다. 배양 후 serum free medium 90 μ l 로 교체하였다. 그리고 각각의 well 에 시료 10 μ l 를 처리하고 다시 15 분 30 분 45 분 60 분 그리고 120 분 까지 시간별로 배양한 후 각 well 에 100 μ l 의 neutral red solution(50 μ g/ml)을 첨가하여 3 시간동안 반응시켰다. Neutral red 가 완전히 plasma membrane 을 통과하여 살아있는 세포 또는 손상받지 않은 세포의 lysosome 에 농축된 후 1.0% formalin/1.0% CaCl₂ 100 μ l 로 고정화한 다음 1.0% acetic acid/50% ethanol solution 을 사용하여 세포 내의 neutral red 를 추출하였다(13). 추출된 neutral red 를 ELISA reader 를 이용하여 540nm 에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험결과는 세포를 배양하지 않은 well 에서 측정된 흡광도로 보정하였다.

2) Assay of oxidative stress formation

Trypsinization 에 의해 회수한 transformed mouse fibroblast L929 를 5% BCS 가 함유된 DMEM· F'10 배지로 현탁시킨 후 96 well tissue culture plate 각각의 well 에 세포현탁액 (5000-10000cells/well) 100 μ l를 접종한 다음, 37°C에서 5% CO₂조건으로 24 시간 배양하였다 배양 후 serum free medium 90 μ l로 교체한 다음 각각의 well 에 시료를 10 μ l를 처리하였다 그리고 15 분 30 분 45 분 60 분 그리고 120 분까지 시간별로 배양한 후 각 well 에 10 μ l의 DCFH-DA(0.1mM/ml, sigma)를 첨가하여 15 분간 반응시켰다. 비형광성의 DCFH 가 세포내 의 활성산소에 의해 산화되면 형광성의 DCF 로 전환되며 이것을 fluorescence reader(excitation/emission 488/530nm, BIO-TEK(FL600))를 이용하여 fluorescence 를 측정하였다. 모든 실험 결과는 DCFH-DA 를 처리하지 않은 세포를 배양한 well 에서 측정된 fluorescence 로 보정하였다(11).

3) Protective activity of antioxidants toward UV radiation

Trypsinization 에 의해 회수한 transformed mouse fibroblast L929 를 5% BCS 가 함유된 DMEM· F'10 배지로 현탁시킨 후 96 well tissue culture plate 의 각 각의 well 에 세포현탁액 (5000-10000cells/well) 100 μ l를 접종한 다음, 37°C에서 5% CO₂조건으로 24 시간 배양하였다 배양 후 serum free medium 90 μ l로 교체한 다음 각각의 well 에 시료를 10 μ l를 처리한 후 다시 1.5mJ/cm²의 자외선(xenon arc lamp)을 조사한 후 15 분 30 분 45 분 60 분 그리고 120 분까지 시간별로 배양한 후 각 well 에 10 μ l의 DCFH-DA(0.1mM/ml)를 첨가하여 15 분간 반응시켰다. 그리고 fluorescence reader(excitation/emission 488/530nm)를 이용하여 fluorescence 를 측정하였다. 모든 실험 결과는 DCFH-DA 를 처리하지 않은 세포를 배양한 well 에서 측정된 fluorescence 로 보정하였다(11).

4) NBT assay

300mM phosphate buffer(pH 7.8)에 triton X-100 1.6ml, EDTA 2.9mg, NBT (Nitro-blue-tetrazolium, sigma) 1mg, hypoxanthine(sigma) 5.4mg 을 넣어 substrate/reactive solution 을 만든다. Xanthine oxidase(sigma) 12 μ l 를 300mM phosphate buffer(pH 7.8) 10ml 에 녹여 enzymatic solution 을 만든다. Spectrophotometer cell 내에 buffer 1.0ml 을 넣은 다음 만들어 놓은 substrate/reactive solution 을 0.5ml 첨가한다. 농도에 따라 희석한 시료를 각각 100 μ l 씩 처리하고 대조군에는 용매만을 동량 처리한다. 여기에 enzymatic solution 0.5ml 을 첨가하고 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 540nm 에서 흡광도를 측정한다(6).

5) DPPH assay

DPPH(Diphenyl-picryl-hydrazyl, sigma)를 methanol 에 녹인다. 이 때 methanol 이 원액인 경우 증발될 가능성이 있으므로 증류수와 6:4 의 비율로 stock solution 을 만들어 녹인다. 이렇게 녹인 DPPH solution 을 513nm 에서 흡광도가 0.6 정도 되게 맞춘다. DPPH solution 2ml 를 농도에 따라 희석한 시료 1ml 에 각각 첨가하여 혼합한다. 상온에서 약 1 시간 동안 방치한 뒤 513nm 에서 흡광도를 측정한다(7).

3. 결과 및 고찰

Cytotoxicity and UV-induced toxicity in antioxidants

수용성 항산화제의 경우 ascorbic acid 를 제외하고 green tea extract 를 1% 처리한 후 시간 별로 15 분 30 분 45 분 60 분 그리고 120 분이 경과한 후에 세포 생존율을 측정한 결과 2 시간 동안 98%의 세포 생존율을 보여주었으며 같은 농도의 α -glucosyl rutin 의 경우에는 2 시간 동안 93%의 세포생존율을 보여주었다. 반면에 ascorbic acid 의 경우에는 0.1% 처리 시 2 시간째 55%의 세포 생존율을 보여주었다(Fig.2). 시료 처리 후 자외선(1.5mJ/cm²)을 조

사한 다음 자외선(1.5mJ/cm²)만 조사한 처리군을 대조군으로 위와 동일하게 시간별로 세포의 생존율을 구한 결과 green tea extract 을 1%에서는 1 시간 동안 92.6%의 세포 생존율을 보여주었으며 α-glucosyl rutin 는 100%의 세포 생존율을 보여주었다. Ascorbic acid 의 경우는 1 시간 경과 시 85.3%의 세포 생존율을 보여주었다 (Fig.4). α-glucosyl rutin 및 green tea extract 의 경우 시료처리 후 세포 생존율과 시료 및 자외선을 함께 처리한 세포 생존율을 비교해 본 결과 거의 차이를 보이지 않았다. 반면에 ascorbic acid 의 경우에는 자외선 조사 시 세포 생존율이 약 10% 전후로 더 높아졌다. 이것은 ascorbic acid 가 자외선에 의한 세포의 손상을 어느 정도 억제시켜주기 때문인 것으로 추측된다(3,14). 지용성 항산화제의 경우에는 0.1% PG 에서만 2 시간 동안 91.4%의 세포 생존율을 보여주었으며 retinol 은 0.01%에서 1 시간 경과 시 70.3% 2 시간째에는 20.6%의 세포생존율을 보여주었다. 그리고 BHT 의 경우에는 0.001%에서도 2 시간내내 평균 10% 전후의 낮은 세포 생존율을 보여주었다. α-tocopherol 의 경우에는 1%에서 1 시간째 79.2%의 세포 생존율을 그리고 2 시간 경과 시에는 54.1%의 세포 생존율을 보여주었다(Fig.3).

시료처리 후 자외선(1.5mJ/cm²) 조사 시 세포 생존율 변화를 알아본 실험에서는 α-tocopherol 를 제외하고 PG 및 retinol 은 경우에는 1 시간내내 평균 30%전후의 낮은 세포 생존율을 보여주었다. 반면에 α-tocopherol 의 경우에는 ascorbic acid 와 마찬가지로 시료처리만 한 경우보다 시료처리 후 자외선을 다시 처리한 다음 측정된 세포 생존율이 약 10% 전후로 더 높은 생존율을 보여주었다(Fig.5). 이것은 ascorbic acid 와 마찬가지로 α-tocopherol 이 자외선에 의한 세포의 손상을 어느 정도 억제시켜주기 때문인 것으로 추측된다(6,8). 위 실험에서 α-tocopherol 를 제외한 지용성 항산화제인 retinol 및 PG 의 경우에는 세포 생존율이 40-55%씩 더 낮아졌다. PG 의 경우 자외선 조사 시 Cu(II)/ Cu(I) redox cycle 이 영향을 받아 Cu(II)을 세포 밖으로 과량 방출시켜 PG/ Cu(II)의 결합을 촉진시키고 이로 인하여 DNA 와 같은 유전인자의 손상을 유도하여 세포 내 독성을 유도하는 것으로 알려져 있으며 retinol 의 경우에는 자외선 조사 시 retinol 의 일부가 retinoic acid 로 전환되어 세포의 독성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다.(15,17). 따라서 자외선에 의해 PG 및

retinol 의 물리적 화학적 특성의 변화가 세포 독성을 증가시킨 것으로 추측된다(16).

Anti-oxidative stress in antioxidants

수용성 항산화제인 green tea extract 및 α -glucosyl rutin 의 경우에는 위 세포 생존율을 참조하여 1%, 0.1% 및 0.01%에서 시간별로 DCFH-DA 를 이용하여 세포 내의 oxidative stress 억제효과를 측정하였으며 ascorbic acid 의 경우에는 0.1%, 0.01% 그리고 0.005%에서 억제효과를 측정하였다(Fig.1).

Green tea extract 의 경우 1% 처리 시 1 시간동안 59.1-69.7%의 oxidative stress 억제효과를 보여주었으며 2 시간째에는 52.3%의 억제효과를 보여주었으며 α -glucosyl rutin 의 경우에는 1%에서 1 시간동안 51.1-68.7% 그리고 2 시간째에는 50.2%의 억제효과를 보여주었다. Ascorbic acid 의 경우에는 0.1%, 0.01% 및 0.005%에서 45 분동안 40-50%의 oxidative stress 억제효과를 보여주었으나 1 시간째 및 2 시간째에는 10-20%로 낮은 억제효과를 보여주었다(Fig.6, 7 및 8).

지용성 항산화제인 retinol 의 경우에는 세포독성으로 인하여 0.01%에서 1 시간째까지만 oxidative stress 억제효과를 측정할 수 있었으며 1 시간동안 18.6-53.1%의 억제효과를 보여주었다. PG 의 경우에서도 세포독성으로 인하여 1%에서는 oxidative stress 억제효과를 측정할 수 없었으며 0.1% 45 분동안 9.4-27.2% 그리고 1 시간째에 43.5% 2 시간째에 52.1%의 억제효과를 보여주었다. α -tocopherol 의 경우에도 세포독성으로 인하여 1%에서 1 시간까지만 oxidative stress 측정이 가능하였으며 1 시간동안 35.7-59.5%의 억제효과를 보여주었다. BHT 의 경우에는 세포독성이 강하여 세포수준에서의 oxidative stress 억제효과를 측정할 수 없었다(Fig.9).

항산화제들의 시간별 oxidative stress 억제효과 측정결과 전체적으로 시간의 경과 및 농도 구배에 따라 oxidative stress 억제효과가 감소하는 경향을 보여주었으나 PG 및 ascorbic acid 의 경우에는 다소 다른 경향을 보여주었다. PG 의 경우에는 시간이 경과할수록 oxidative stress 억제효과가 증가하였으며 ascorbic acid 의 경우에는 0.1%, 0.01% 및 0.005% 모두 일

정한 oxidative stress 억제효과를 보여주었다. Green tea extract 는 항산화 효과를 가지고 있는 대표적인 식물추출물로서 catechins 및 caffeine 그리고 다양한 flavonoid 를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 green tea extract 는 항산화 효과를 가진 생약성분들로 구성되어 있어 세포에 자극을 덜 주면서 용이하게 세포 내로 흡수되어 oxidative stress 억제효과를 보여주는 것으로 추측된다(18). α -glucosyl rutin 는 대부분의 식물체에서 발견되는 flavonolglycoside 인 rutin 에 dextrin 을 결합하여 만든 물질로 rutin 에 비하여 높은 수용성을 보여 주는 것으로 알려져 있다(19). 그래서 green tea extract 와 마찬가지로 세포에 자극을 적게 주기 때문에 상대적으로 높은 농도에서의 처리가 가능하여 세포 내로 상대적으로 많은 양이 분산되어지고 이로 인하여 세포 내 oxidative stress 을 억제효과가 높은 것으로 추측된다(20). 지용성 항산화제인 PG 의 경우에는 1%에서 세포독성으로 인하여 세포수준에서의 oxidative stress 억제효과를 측정할 수 없었으며 0.1% 및 0.01%에서 측정한 결과 시간이 경과됨에 따라 oxidative stress 억제효과가 증가됨을 보여주었다(Fig. 9 및 10). 이것은 PG 가 세포 내로 분산되어지는 것보다는 세포막부위에 주로 집적되기 때문으로 보여진다(21). retinol 의 경우에도 세포독성으로 인하여 1% 및 0.1%에서는 세포수준에서의 oxidative stress 억제효과를 측정할 수 없었으며 0.01%에서도 1 시간까지만 측정이 가능하였다. α -tocopherol 의 경우에도 농도구배 및 시간의 경과에 따라 oxidative stress 억제효과가 떨어지는 경향을 보여 주었다(Fig. 9 및 10).

Protective activity of antioxidants toward UV radiation

항산화제를 세포에 처리한 후 자외선(1.5mJ/cm²)을 조사한 다음 DCFH-DA 를 이용하여 세포 내에서 항산화제의 oxidative stress 억제효과 변화여부를 측정하였다. 수용성 항산화제인 ascorbic acid, green tea extract 및 α -glucosyl rutin 의 경우 oxidative stress 억제효과가 약 20% 정도 낮아졌다. Green tea extract 의 경우 1%에서 15 분 및 30 분째 각각 34.5% 및 28.9%의 oxidative stress 억제효과를 보여주었으며 45 분째에는 15.8% 그리고 1 시간경과 후에는 1.2%로 거의 억제효과가 관찰되지 않았다. α -glucosyl rutin 의 경우에도 1%에서 15

분 및 30 분째 39.7% 및 22.8%의 억제효과를 보여주었으며 45 분 및 1 시간경과 시에는 5.5% 및 1.1%로 매우 낮은 억제효과를 보여주었다. Ascorbic acid 의 경우에도 1 시간동안 14.8-25%로 억제효과가 자외선을 조사하지 않았을 때보다 떨어졌다. 지용성 항산화제인 retinol, α -tocopherol 및 propyl gallate(PG) 경우에는 α -tocopherol 를 제외하고 자외선 조사 시 세포의 독성치가 증가되어 세포수준에서의 oxidative stress 억제효과를 측정할 수 없었다. α -tocopherol 은 1%에서 15 분 및 30 분째 각각 29.2% 및 26.4%의 억제효과를 보여주었으며 45 분 및 1 시간 경과 시에는 각각 5.3% 및 2.1%로 거의 억제효과가 관찰되지 않았다(Fig. 11 및 12). 이와 같이 자외선 조사 시 세포의 oxidative stress 억제효과가 떨어지는 것은 자외선에 의해 항산화제의 물리적 화학적 안전성이 변화되면서 항산화 기능이 저하되었거나 세포 내의 과량의 활성산소가 형성되기 때문인 것으로 추측된다(22, 23).

자외선으로부터 항산화제를 안정화시키는 방법을 알아보기 위하여 0.005%의 ascorbic acid 를 일반 유화상태 및 인지질을 이용한 capsulation 상태로 만든 후 자외선을 조사하여 oxidative stress 억제효과의 변화 여부를 알아보았다. 그 결과 일반 유화상태의 경우 1 시간 동안 약 4.9-5.9%로 거의 oxidative stress 억제효과를 관찰할 수 없었으며 ascorbic acid 원액만 0.005%를 처리한 경우와 비교해도 큰 차이를 보여주지 않았다. 반면에 인지질을 이용한 capsulation 상태에서는 1 시간동안 25.1-26.7%의 oxidative stress 억제효과를 보여주었다(Fig. 13).

NBT(Nitro-blue-tetrazolium) reduction in antioxidants

지용성 항산화제들인 retinol, α -tocopherol, PG 및 BHT 와 수용성 항산화제인 ascorbic acid, green tea extract 및 α -glucosyl rutin 의 세포 내 oxidative stress 억제 효과에 대한 기작을 알아보기 위하여 superoxide anion 의 소거능을 알아볼 수 있는 NBT 를 실시하였다. 수용성 항산화제인 α -glucosyl rutin 의 경우 1%에서 79%의 억제효과를 보여주었으며 0.1%에서는 35% 그리고 0.01%에서는 10%로 농도구배에 따라 superoxide anion 의 소거능이 떨어지는 경향을 보여주었다. Green tea extract 의 경우에는 1%에서 35%, 0.1%에서 22% 그리고

0.01%에서 18%의 superoxide anion 의 소거능을 보여주었다.(Fig. 14). Ascorbic acid 의 경우에는 NBT 를 이용하여 superoxide anion 의 소거능을 측정할 수 없었다. 이것은 ascorbic acid 의 높은 활성으로 인하여 NBT dye 와 ascorbic acid 와 직접 결합하기 때문인 것으로 보여진다(24). Retinol, PG, BHT 및 α -tocopherol 중에서 PG 가 가장 두드러진 superoxide anion 의 소거능을 보여주었다. PG 1%, 0.1% 및 0.01%에서 각각 74%, 70% 및 68%의 superoxide anion 의 소거능을 보여주었으며 α -tocopherol 의 경우에는 1%에서 75% 그리고 0.1% 및 0.01%에서는 각각 35% 및 28%의 superoxide anion 의 소거능을 보여주었다. BHT 의 경우에는 1%, 0.1% 및 0.01%에서 각각 56%, 22% 그리고 20%의 superoxide anion 의 소거능을 보여주었다. 그러나 retinol 의 경우 상대적으로 매우 낮은 super-oxide anion 의 소거능을 보여주었다(Fig. 15). NBT 실험결과 PG 를 제외하고 나머지 항산화제들의 경우 농도구배에 따라 superoxide anion 의 소거능이 떨어졌으며 α -tocopherol 및 α -glucosyl rutin 는 1%에서만 70%이상의 superoxide anion 의 소거능을 보여준 반면에 PG 의 경우 1%, 0.1% 및 0.01% 모두 70%전후의 두드러진 superoxide anion 의 소거능을 보여주었다.

DPPH(Diphenyl-picryl-hydrazyl) assay in antioxidants

항산화제들의 hydroxyl radical 에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 DPPH assay 를 실시하였으며 수용성 항산화제인 ascorbic acid, green tea extract 및 α -glucosyl rutin 및 지용성 항산화제인 retinol, α -tocopherol, PG 및 BHT 모두에서 두드러진 hydroxyl radical 에 대한 활성 억제효과를 보여주었다. 특히 지용성 항산화제들이 전반적으로 ascorbic acid 을 제외하고 수용성 항산화제들 보다 10-15% 정도 더 높은 hydroxyl radical 에 대한 활성 억제효과를 보여주었다. 이것은 비극성 성질을 가진 항산화제들이 보다 잘 비극성 물질인 DPPH 가 용해되어 있는 기질에 확산되기 때문인 것으로 추측된다(25). α -tocopherol 및 PG 모두 1% 0.1% 및 0.01%에서 96-98%의 높은 hydroxyl radical 에 대한 활성 억제효과를 보여주었다. 그리고 retinol 의 경우에도 1%, 0.1% 및 0.01%에서 각각 97%, 92% 및 81%의 hydroxyl radical 에 대한 활성 억제효과를 보여주었으며 BHT 의 경우에는 retinol, α -tocopherol 및

PG 보다 다소 떨어지는 hydroxyl radical 에 대한 활성 억제효과를 보여주었다(Fig.17). 수용성 항산화제인 ascorbic acid 도 1%, 0.1% 및 0.01%에서 97-98%의 hydroxyl radical 에 대한 활성 억제효과를 보여주었으나 green tea extract 및 α -glucosyl rutin 의 경우에는 75-87%로 다소 낮은 hydroxyl radical 에 대한 활성 억제효과를 보여주었다(Fig. 16).

4. 결론

지용성 항산화제들인 retinol, α -tocopherol 및 PG 와 수용성 항산화제인 ascorbic acid, green tea extract 및 α -glucosyl rutin 에 대하여 세포수준에서의 oxidative stress 억제효과를 DCFH-DA 를 이용하여 확인해 볼 수 있었다. 그러나 BHT 의 경우에는 세포독성으로 인하여 세포수준에서의 oxidative stress 억제효과를 확인해 볼 수 없었으나 NBT 및 DPPH 에서는 항산화 효과를 확인해볼 수 있었다. 전반적으로 세포수준에서의 oxidative stress 에 대한 억제효과는 수용성 항산화제인 ascorbic acid, green tea extract 및 α -glucosyl rutin 에서 두드러진 억제효과를 보여주었다. 반면에 지용성 항산화제인 retinol, α -tocopherol, PG 및 BHT 의 경우에는 NBT 및 DPPH 에서 두드러진 억제효과를 보여주었다. 이것은 수용성 항산화제인 green tea extract 및 α -glucosyl rutin 가 상대적으로 세포에 대한 자극이 적어 세포 내로 분산되어지는 양이 많기 때문인 것으로 보여진다. Ascorbic acid 의 경우에는 green tea extract 및 α -glucosyl rutin 의 경우 0.01%이하에서는 두드러진 억제효과를 보여주지 못하였으나 ascorbic acid 경우에는 0.005%에서도 두드러진 oxidative stress 억제효과를 보여주었다. 이것은 DPPH assay 에서 보여 주듯이 ascorbic acid 가 상대적으로 green tea extract 및 α -glucosyl rutin 보다 낮은 농도에서도 높은 활성 산소 소거능을 가지고 있음을 보여주고 있다. 반면에 지용성 항산화제인 retinol, α -tocopherol, PG 및 BHT 의 경우에는 세포에 대한 자극이 높고 친유성적인 특징이 세포 내로 분산되어지는 것 보다는 세포막 부위에서 보다 두드러진 활성산소에 대한 방어 효과를 보여주는 것으로 추측된다. 특히 PG 및 retinol

의 경우 시료처리 후 자외선 조사 시의 세포 생존율의 변화를 알아본 실험에서 세포생존율이 떨어지는 경향을 보여주었다. 그리고 시료처리 후 자외선 조사 시 세포 내의 oxidative stress 억제효과 변화 여부를 알아본 실험에서는 ascorbic acid, green tea extract, α -glucosyl rutin 및 α -tocopherol 모두 1%에서 약 30%전후로 억제효과가 떨어졌다. 또한 0.005% ascorbic acid 원액 및 유화상태 그리고 인지질을 이용한 capsulation 상태로 나누어 처리 후 자외선을 조사한 후 oxidative stress 억제효과 변화 여부를 알아본 실험에서 인지질을 이용한 capsulation 상태에서만 25%전후의 억제효과를 보여주었다. 이것은 자외선으로부터 항산화제의 활성을 유지시킬 수 있는 방법이 필요하며 인지질을 이용한 capsulation 이 그 한가지 방법임을 보여주고 있다.

References

1. Y. Shindo, et al., Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin, *J. Invest. Dermatol.*,102,122-128(1994).
2. K. Scharffetter-Kochanek, et al. UV-induced reactive oxygen species in photo-carcinogenesis and photoaging, *Bio.Chem.*,378,1247-1252(1997).
3. I. Benoit, V. Simard, G. Passaro, A Global Approach to Skin Aging, I.F.S.C.C. Conference, 11-17(1999).
4. B.S. Berlett and E.R. Stadman, Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress, *J. of Biol. Chem.*,272, 20313-20316(1997).
5. S.Y. Schubert, E.P. Lansky, I. Neeman, Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J. Ethno-pharmacol.*,66, 11-17(1999).
6. F. Stab, G. Lanzendorfer, U. Schonrock, H. Wenck, Novel Antioxidants: New Strategies in Product Stabilization and Skin Protection, *SOFW-Journal.*,124, 604-612(1998).

7. T.P. Krishnakantha, B.R. Lokesh, Scavenging of superoxide anions by spice principles, 30, 133-134(1993).
8. H. Zhang, E. Agardh, C.D. Agardh, Nitro blue tetrazolium staining and hydrogen peroxide production in rat retina in vitamin E deficiency and after light exposure, *Gracefe's Clin Exp Ophthalmol*, 232,312-317(1994).
9. C.Y. Hong, C.P. Wang, S.S. Huang and F.L. Hsu, The Inhibitory Effect of Tannins on Lipid Preoccupation of Rat Heart Mitochondria, *J. Pharm. Pharmacol.* 47, 138-142(1994).
10. I.D. Trayner, A.P. Rayner, G.E. Freeman, F. Farzaneh, Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate(H₂DCF-DA) or dihydrorhodamine 123(H₂R123), 186, 275-284(1995).
11. A.R. Rosenkranz, S. Schmaldienst, K.M. Stuhlmeier, W. Chen, W. Knapp and C.J. Zlabinger, Amicroplate assay for the detection of oxidative product using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, 156, 39-45(1992).
12. K. Shimoda, M. Nomura, M. Kato, Effect of antioxidants, anti-inflammatory drugs and histamine antagonists on sparfloxacin-induced phototoxicity in mice, 31, 133-140(1996).
13. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J.Immunol.Meth.*,65,55-62(1983).
14. Y. Kohno, T. Yamashita, M. Egawa, Peroxidation in human skin and its prevention, *I.F.S.C.C. International Conference*, 83-1009(1997).
15. H. Jacobi, B. Eicke, I. Whitte, DNA strand break induction and enhanced cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper(II), 24, 972-978(1998).
16. B.L. Kaul, Cytogenetic activity of some common antioxidants and their interaction with x-rays,67,239-247(1979).
17. E. Andersson, I. Rosdahl, A Vahlquist, Ultraviolet irradiation depletes cellular retinol and alters the metabolism of retinoc acid in cultured human keratinocytes and melanocytes, 9, 339-

346(1999).

18. D. Eeba, P. Riso, A. Colombo, G. Testolin, Supplementation of Jurkat T-cell with green tea extract decreases oxidative damage due to iron treatment, *J. Nutr.*, 129, 2130-2134(1999).
19. K. Nakata, N. Morita, H. Horii, M. Chubachi, Oxidative intermediates of α -glucosyl rutin by pulse radiolysis, *Radiat. Phys. Chem.*, 50(5), 441-448(1997).
20. P.A. Steerenberg, J. Grassen, P. Dortant, P.C. Hollman, G. M. Alink, M. Dekker, H.B. Bueno de Mesquita, H. Van Loveren, Protection of UV-induced suppression of skin contact hypersensitivity: a common feature of flavonoids after oral administration, *Photochem. Photobiol.* 67, 456-461(1998).
21. J. Vora, M. Montague, M. Penn, K. Erow, Influence of dosing vehicle on the preclinical pharmacokinetics of phenolic antioxidants, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 104, 93-106(1999).
22. M. Lopez-torres, J.J. Thiele, Y. Shindo, D. Han, L. Pancker, Topical diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin, 138, 207-215(1998).
23. D. Darr, S. Dunston, H. Faust, S. Pinnell, Effectiveness of Antioxidants(Vitamin C and E) With and Without Sunscreens as Topical Photoprotectants, *Acta Derm Venereol.* 76, 264-268(1996).
24. J.J. Lee, C.W. Lee, Y.H. Cho, S.M. Park, B.C. Lee, H.B. Pyo, Tinged autumnal leaves of maple and cherry trees as potent antioxidant sources, *Cosmet. & Toilet*, 115, 39-46(2000).
25. H. Sakagami, K. Satoh, Y. Makino, T. Kojima, M. Takeda, Effect of α -tocopherol on cytotoxicity induced by UV irradiation and antioxidants, 17, 2079-2082(1997).

A.



B.

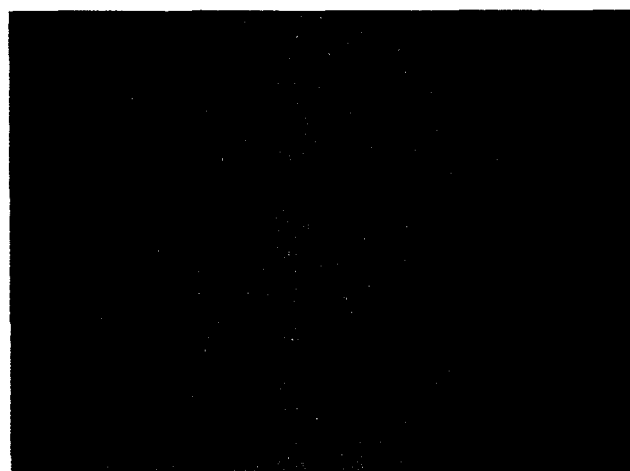


Fig. 1. Fibroblast in monolayer culture after treatment of DCFH-DA

A. Treatment of 1% green tea extract

B. Control