

포도 추출물들의 자유 라디칼 소거 작용 및 마우스 대식세포주의 염증 발현 매개 인자들에 대한 생성 억제 효과

민혜영 · 박은정 · 이상국 · 조용진^{1,*}
이화여자대학교 약학대학, ¹한국식품개발연구원

Effects of Grape Extracts on Free Radical Scavenging Activity and Inhibition of Pro-Inflammatory Mediator Production in Mouse Macrophage Cells

Hye-Young Min, Eun-Jung Park, Sang-Kook Lee and Yong-Jin Cho^{1,*}

College of Pharmacy, Ewha Womans University
¹Korea Food Research Institute

Antioxidant and anti-inflammatory potentials of various grape extracts were evaluated. Extracts from Kyho seed, Kyho stem, and Campbell seed showed potent 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities compared to resveratrol ($IC_{50} = 16.9, 21.5, 21.9, 34.6 \mu\text{g/mL}$, respectively), among which, antioxidant effect of Kyho seed extract were similar to that of vitamin C ($IC_{50} = 12.2 \mu\text{g/mL}$). These extracts also exhibited inhibitory activities on lipopolysaccharide (LPS)-induced prostaglandin E_2 production and nitrite formation in mouse macrophage RAW 264.7 cells at $50 \mu\text{g/mL}$. Kyho stem and seed extracts showed growth inhibitory activities in human lung and colon cancer cells. These results suggest the potential roles of grape extracts as antioxidants and anti-inflammatory agents.

Key words: grape extracts, free radical scavenging, prostaglandins, iNOS, mouse macrophage cells

서 론

프로스타글란딘류(prostaglandins, PGs), 일산화질소(nitric oxide, NO) 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 체내 항상성 유지 및 세포 신호 전달(signal transduction)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁻³⁾. 하지만 ROS는 조직손상, 염증 발현, 각종 퇴행성 질환 및 암화(carcinogenesis)를 매개하는 인자로 작용하며⁽⁴⁻⁶⁾, 또한 유도성 cyclooxygenase(COX-2) 및 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 과다하게 생성된 PGs와 NO에 의해 염증 반응의 악화 및 암화가 촉진되는 것으로 보고되고 있다^(3,8-10,12-13). ROS에는 superoxide anion($O_2 \cdot^-$), hydrogen peroxide(H_2O_2), 그리고 hydroxy radical($\cdot OH$) 등이 포함되는데, 이들은 호흡 및 대사 과정을 통해 지속적으로 생성되므로 체내에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GPxes), catalase와 같은 효소를 이용하여 ROS에 의한 손상을 막는다. 그러나 ROS에 의하여

장기간에 걸친 DNA, 세포막 및 단백질 손상이 일어나게 되면 각종 염증 질환 및 퇴행성 질환 등을 유발하는 원인이 된다^(4,6). 또한, PGs는 세포막 구성 성분인 arachidonic acid를 기질로 하여 cyclooxygenase(COX)라는 효소에 의해 합성된다. COX는 cyclooxygenase-1(COX-1) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)의 2가지 이성 효소로서 존재한다^(3,7). COX-1은 대부분의 체내 조직에서 일정 수준을 유지하여 발현되어 혈관 확장, 신혈류량 유지, 위점막 보호 작용 등 항상성 유지에 필수적인 PGs를 생성한다. 반면 COX-2는 정상 조직에서는 거의 발현이 되지 않다가 염증성 인자, 세포 성장 인자, 발암 원 및 종양 촉진 인자 등에 의해 유도되어 다량의 PGs를 순간적으로 생성시켜 각종 염증 반응을 일으킨다. 또한 여러 암세포에는 COX-2가 과다하게 발현되어 암세포의 증식 및 전이를 촉진하고 apoptosis를 억제하는 역할을 한다⁽⁸⁻¹⁰⁾. 한편, NO의 경우에도 PGs와 마찬가지로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 만들어지며, NOS도 항상성 유지에 필요한 NO를 생성하는 endothelial NOS(eNOS) 및 neuronal NOS(nNOS)와 염증성 인자 등에 의해 유도되는 inducible NOS(iNOS)로 분류할 수 있는데⁽¹¹⁾, iNOS도 COX-2와 마찬가지로 여러 염증 질환, 순환계 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려지고 있다^(12,13).

*Corresponding author : Yong-Jin Cho, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-dong, Songnam 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9136
Fax: 82-31-780-9228
E-mail: yjcho@kfri.re.kr

이와 같이, ROS, PGs 및 NO가 여러 질병 및 암화 과정에 밀접한 연관이 있기 때문에 이들을 조절할 수 있는 물질이 각종 질환의 치료제 또는 예방제로서 주목을 받고 있다. 그리하여 기존의 물질을 구조 변형하여 효과가 개선된 새로운 물질을 합성하거나 천연물 및 각종 식품류에서 새로운 물질을 탐색하는 방향으로의 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 특히 식품류는 의약품에 비해 장기간 섭취 시에도 안전하고 친숙하게 접할 수 있다는 장점 때문에 암을 비롯한 각종 질환의 예방 목적으로 각광을 받고 있으며 실제로 차류의 polyphenol, 콩류의 isoflavone, curcumin, sulforaphane, resveratrol 등 식품 및 천연물 유래 물질들이 암예방제로서 임상 시험 중에 있다⁽¹⁴⁾. 최근에 적포도주가 동맥 경화와 같은 심장병 예방에 효과가 있다는 보고가 등장하면서 포도 및 그 관련 제품 또는 추출물에 대하여 관심이 높아지고 있다. 적포도주의 이러한 약리작용은 procyanidin, anthocyanin, viniferine, resveratrol 등 다가 페놀성 물질(polyphenolics)에 의한 것으로 알려지고 있다⁽¹⁵⁾. 그 중에서 resveratrol은 stilbene 계열의 물질로서 포도 껍질에 주로 분포하며, 지방 과산화 억제 및 free radical 소거 기능과 같은 항산화 작용, COX 저해 등의 항염증 작용, 암세포 성장 억제 및 암예방 효능 등 다양한 생리활성을 지니고 있어⁽¹⁶⁻²⁰⁾, 기능성 식품 및 의약품의 원료로서 가치가 크다고 할 수 있다. 하지만 포도 껍질로부터의 수득률이 낮고 추출에 많은 시간이 소요되므로 포도 자체에서부터 다량을 확보하는 데에는 어려움이 있다. 따라서 포도 껍질로부터 resveratrol을 높은 농도로 함유한 추출물을 정제하고 관련 공정을 개발하는 데에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.

이러한 배경을 바탕으로 하여, 본 논문에서는 국내 포도 관련 산업의 고도화에 기여하기 위하여 국내에서 생산되는 포도의 씨, 껍질 및 송이줄기로부터 추출된 추출물에 대하여 항산화 작용, 염증 관련 인자 생성에 미치는 활성 및 암세포 성장에 대한 영향들의 생리 활성을 측정하였다.

실험 방법

포도 추출물 제조

수확적기에 생산된 거봉(천안, 2001년 9월산)과 캠벨(영동, 2001년 9월산)을 껍질, 씨 및 송이줄기로 분리하여 냉동건조 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 각 포도 부위별 분쇄 시료를 에탄올 : 물(8 : 2, v/v) 용액에 현탁하고 실온에서 47 kHz의 초음파처리기(Branson 5210)로 현탁액 1 L당 0.04 kW의 초음파 에너지를 3분간 가하여 추출하고, 원심분리(10,000×g, 15분) 후 상층액을 감압증발시켜 추출물을 제조하였다.

시약

Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), minimum essential medium with Earle's salt(MEME), fetal bovine serum, non-essential amino acid solution, L-glutamine, trypsin-EDTA 등은 GIBCO-BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), vitamin C, lipopolysaccharide(LPS), N-(1-naphthyl)ethylenediamine, sulfanilamide, sodium nitrite, MTT, sulforhodamine B(SRB)

등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Prostaglandin E₂(PGE₂)와 PGE₂-acetylcholinesterase tracer는 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였고, 항-PGE₂ 항체는 (주)태평양기술연구원으로부터 제공받아 사용하였다.

세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7은 10% FBS가 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 계대 배양하였고, 사람 폐암세포주인 A549 및 대장암세포주인 Col2는 10% FBS가 포함된 minimum essential medium with Earle's salt(MEME)를 이용하여 같은 조건에서 계대 배양하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 자유 라디칼 소거법에 의한 항산화 능력 평가

시료를 농도가 10 mg/mL가 되도록 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 다음 5배씩 연속적으로 희석하여 각각을 96 well plate에 넣었다. 그 다음 순수한 에탄올에 녹인 DPPH 용액을 최종 농도가 300 μM이 되도록 가하였다. 이후 37°C에서 30분 동안 반응시키고 microplate reader(Bio-Rad)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 DMSO를 사용하였으며 % inhibition은 대조군의 흡광도와 시료의 흡광도를 비교하여 구하였다. 실험결과는 IC₅₀ 값으로 표시하여 각 시료의 효력을 평가하였다.

Lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도된 cyclooxygenase-2(COX-2) 저해 활성 검색

RAW 264.7 세포를 1 mL 당 5×10⁵개로 희석하여 96 well plate에 부착시켰다. 이때 세포에 잔존하는 cyclooxygenase(COX) 효소의 활성을 억제하기 위하여 최종 농도가 500 μM이 되도록 aspirin을 2시간 동안 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, 부착된 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)으로 2번 세척하고 5% FBS-DMEM을 가하고 LPS(1 μg/mL)와 검색 시료를 동시에 처리하였다. 이 때 대조군에는 LPS를 처리하지 않았으며 대조군 및 LPS 처리 대조군에는 DMSO를 가하였다. 시료 처리 후 20시간이 지난 다음 상층액을 회수하여 상층액에 유리된 prostaglandin E₂(PGE₂)의 양을 다음의 효소면역분석법으로 정량하였다. 즉, 항-PGE₂ 항체가 부착되어 있는 plate의 각 well에 회수한 상층액과 PGE₂-acetylcholinesterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 이상 배양한 다음, 각 well을 0.05% tween-20-PBS로 5회 세척하고 Ellmann 시액을 가하여 7시간 동안 배양하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂ 표준품으로 검량선을 작성하여 각 시료 처리군에서의 PGE₂ 생성량을 구하였으며, LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 PGE₂ 양의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 PGE₂ 생성 억제율을 구하였다.

LPS에 의해 유도된 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 저해 활성 검색

RAW 264.7 세포를 phenol red가 포함되어 있지 않은

DMEM에 1 mL 당 5×10^5 개가 되도록 현탁하여 24 well plate에 24시간 동안 부착시켰다. 부착된 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 FBS가 함유되어 있지 않은 DMEM을 가하고 LPS($1 \mu\text{g/mL}$)와 시료를 동시에 처리하여 20시간 동안 배양하였다. 이 때 대조군에는 LPS를 처리하지 않았으며 대조군 및 LPS 처리 대조군에는 DMSO를 가하였다. 배양 후 96 well plate에 well당 상층액을 $100 \mu\text{L}$ 씩 가하고 Griess 시약 ($5\% \text{H}_3\text{PO}_4$ 용액에 녹인 $0.2\% \text{N-(1-naphthyl) ethylenediamine}$ 용액과 $0.2\% \text{sulfanilamide}$ 용액을 같은 비율로 섞은 것)을 $180 \mu\text{L}$ 씩 가하여 10분간 가볍게 흔들어 준 다음 540nm 에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 표준품으로 하여 검량선을 작성하여 시료 처리군에서의 흡광도를 nitrite의 농도로서 환산하여 정량하였고, LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 NO 생성 저해 활성을 구하였다.

Sulforhodamine B(SRB)법을 이용한 암세포 성장 저해 평가

사람 폐암세포주인 A549 및 대장암세포주인 Col2를 1 mL 당 5×10^4 개가 되도록 MEME 배지로 희석하여 시료와 함께 96 well plate에 넣고 3일 동안 배양하였다. 또한 최소 16 well에 세포현탁액을 넣고 30분 동안 배양하여 zero-day control로 하였다. 배양한 세포에 대하여 TCA를 최종 농도가 10%가 되도록 가한 다음 4°C 에서 1시간 동안 반응시켜 세포를 고정시켰다. 고정 후 $0.4\% \text{SRB}$ 용액으로 염색하고 염색된 세포를 $10 \text{mM Tris-base(pH 10)}$ 를 가하여 용해시킨 다음 515nm 에서 흡광도를 측정하였다. $10\% \text{DMSO}$ 를 처리한 군을 대조군으로 하여, 대조군과 zero-day control의 차이를 기준으로 시료를 처리한 군에서의 세포 생존률을 구하였다.

통계 처리

모든 시험은 적어도 2회 이상 반복하였고, 그 결과는 반복 시험에서의 평균값 $\pm \text{SEM}$ 으로 구하였다. 또한 대조군과 처리군의 차이는 Student's *t*-test로 비교하였으며 대조군과 비교하여 $p < 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험 결과

포도 추출물들의 DPPH 자유 라디칼 소거 활성

여러 포도 추출물들의 항산화 효능을 알아보기 위하여 수용액 또는 에탄올 중에서 비교적 안정된 자유 라디칼을 형성하는 DPPH를 이용하여 추출물들의 라디칼 소거 능력을 측정하였다. 양성 대조군으로는 vitamin C를 이용하였다. 그 결과 Table 1 및 Fig. 1에 나타난 바와 같이 거봉줄기, 캠벨줄기, 캠벨씨 및 거봉씨 추출물들은 $500 \mu\text{g/mL}$ 에서 70~80% 정도의 프리 라디칼 소거능을 나타내었다. 이 중 거봉줄기, 캠벨씨, 거봉씨 추출물들은 IC_{50} 값이 $20 \mu\text{g/mL}$ 전후로 나타나 resveratrol($\text{IC}_{50} = 34.6 \mu\text{g/mL}$)보다 항산화 작용이 우수하였고, 특히 거봉씨 추출물은 vitamin C와 거의 유사한 효력을 나타내었다.

Table 1. Effect of various grape extracts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity

Sample	Free radical scavenging activity ¹⁾ (% Inhibition)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Kyho stem	89.9 ± 0.2	21.5
Kyho seed	72.9 ± 2.3	16.9
Kyho skin	41.7 ± 3.1	>500
Campbell stem	71.9 ± 1.4	87.3
Campbell seed	76.9 ± 0.7	21.9
Campbell skin	54.1 ± 1.4	446.7
Resveratrol	77.5 ± 0.1	34.6
Vitamin C	89.9 ± 0.2	12.2

¹⁾Free radical scavenging activity of test sample was determined relative to DMSO-treated control groups. Each value represents mean $\pm \text{SEM}$ (n=2).

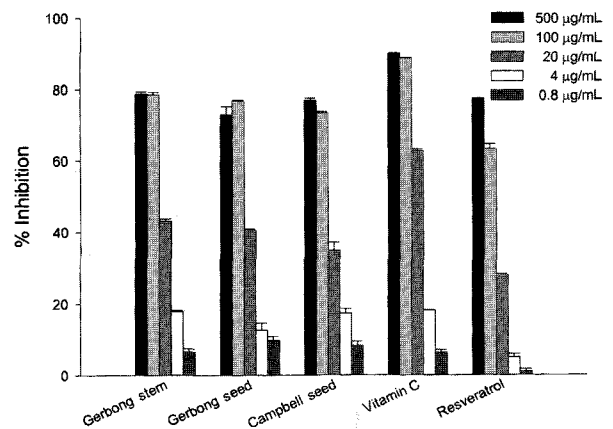


Fig. 1. Effect of various grape extracts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity.

Grape extracts were incubated with DPPH ethanolic solution ($300 \mu\text{M}$) at 37°C . After 30 min, absorbance was measured at 515nm . Free radical scavenging activity of each sample was determined relative to DMSO-treated control groups. Each value represents mean $\pm \text{SEM}$ (n=2).

포도 추출물들의 lipopolysaccharide(LPS) 처리에 의한 PGE₂ 생성 저해 활성

Table 2 및 Fig. 2에 나타난 바와 같이, 포도 추출물들은 $50 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의한 prostaglandin E₂(PGE₂)의 생성을 억제하였다. 거봉줄기, 거봉씨, 캠벨씨 추출물은 $50 \mu\text{g/mL}$ 에서 60~70% 정도의 PGE₂ 생성 억제 효과를 나타내었고, 캠벨줄기 추출물은 40% 정도의 억제율을 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 celecoxib 및 resveratrol은 IC_{50} 이 각 0.9ng/mL 과 $1.9 \mu\text{g/mL}$ 로 나타나 PGE₂ 생성을 효과적으로 억제하였다.

LPS 처리에 의해 유도된 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 대한 포도 추출물들의 저해 활성

포도 추출물들이 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의

Table 2. Effect of various grape extracts on LPS-induced prostaglandin E₂ (PGE₂) production in RAW 264.7 cells

Sample	% Inhibition at 50 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
Kyho stem	72.0 ± 3.3	NT ³⁾
Kyho seed	61.3 ± 1.3	NT
Kyho skin	11.2 ± 11.1	>50
Campbell stem	41.9 ± 0.8	>50
Campbell seed	59.4 ± 0.8	NT
Campbell skin	0.0 ± 1.4	>50
Resveratrol	100.0 ± 0.1 ¹⁾	1.9
Celecoxib	100.0 ± 0.3 ²⁾	0.9 ⁴⁾

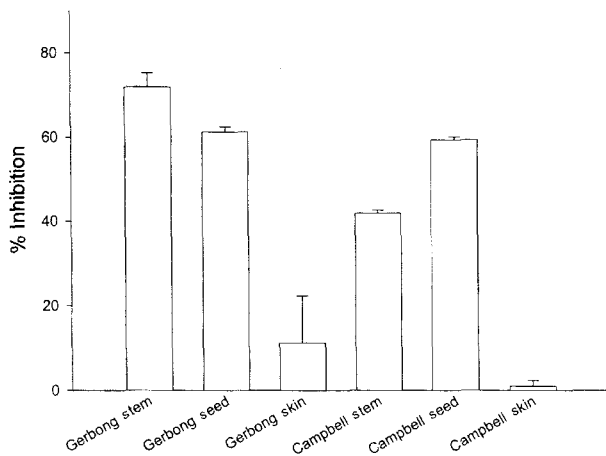
Each value represents mean ± SEM (n=3).

¹⁾% Inhibition at 10 µg/mL.

²⁾% Inhibition at 100 ng/mL.

³⁾Not tested.

⁴⁾Concentration: ng/mL.

**Fig. 2. Effect of various grape extracts on lipopolysaccharide (LPS)-induced prostaglandin E₂ (PGE₂) production.**

RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence or absence of test samples. After 20 hr, the amount of PGE₂ in the supernatants was determined by enzyme immunoassay. Each value represents mean ± SEM (n=3).

해 생성되는 NO의 양을 얼마나 감소시키는지를 마우스 대식 세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 확인하여 보았다. 실험 결과, Table 3 및 Fig. 3에서 알 수 있듯이 거봉줄기와 거봉씨 추출물들은 50 µg/mL에서 NO 생성을 50% 정도 저해하였고, 캠벨씨 추출물도 약간의 NO 생성 저해 작용을 나타내었다. 이 실험조건에서 resveratrol은 IC₅₀이 2.1 µg/mL로 나타났다.

포도 추출물들의 암세포 성장에 대한 영향 조사

각종 포도 추출물들이 암세포 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 사람 폐암세포주인 A549와 대장암세포주인 Col2를 이용하여 세포 생존율을 관찰하였다. Table 4 및 Fig. 4에서 나타난 것과 같이, 50 µg/mL에서 거봉줄기 및 거봉씨 추출물은 폐암세포의 성장을 대조군에 비하여 30% 가량 억제하였고, 결장암세포의 성장은 20~30% 정도 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 resveratrol 20 µM에서의 암세포 성장 저해 효과와 유사하였다.

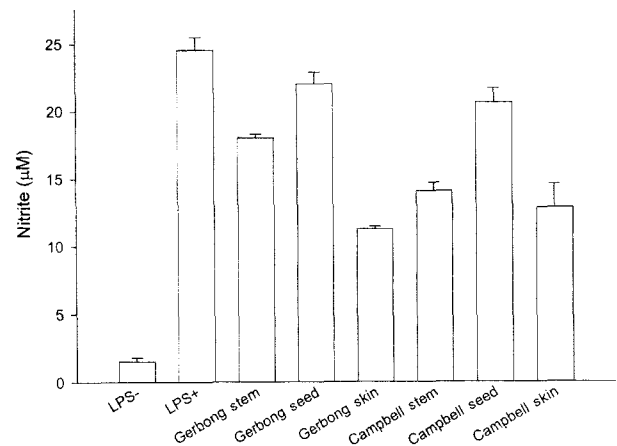
Table 3. Effect of various grape extracts on nitrite formation in LPS-stimulated mouse macrophage cells

Sample	% Inhibition at 50 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
Kyho stem	57.7 ± 0.9	NT ²⁾
Kyho seed	50.8 ± 7.5	NT
Kyho skin	17.0 ± 4.6	>50
Campbell stem	11.0 ± 3.8	>50
Campbell seed	45.5 ± 2.6	>50
Campbell skin	28.4 ± 1.2	>50
Resveratrol	89.5 ± 0.7 ¹⁾	2.1

Each value represents mean ± SEM (n=4).

¹⁾% Inhibition at 10 µg/mL.

²⁾Not tested.

**Fig. 3. Effect of grape extracts on nitrite accumulation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/mL) were plated in 24 well plate for 24 hr and then incubated with LPS (1 µg/mL) and test samples simultaneously. After 20 hr, the nitrite accumulation of cultured media was determined by Griess reaction. Each value represents mean ± SEM (n=4).

고 찰

식품류를 포함한 천연물은 예로부터 건강 증진 및 질병 치료를 위하여 다양하게 이용되어 왔고, 실제로 aspirin, morphine, ephedrine 등과 같이 천연물에서 유래한 의약품이 현재에도 질병 치료에 널리 응용되고 있다. 최근 ROS 및 여러 염증 관련 매개체들이 각종 질병에 밀접하게 연관되어 있다는 여러 연구 결과가 발표되면서 항산화 및 항염증 효능을 가진 물질들이 질병 치료 및 예방제로서 주목을 받고 있는데, 특히 식품류 및 천연물에 포함되어 있는 polyphenol성 화합물들은 항산화, 항돌연변이, 암세포 성장 억제 등 다양한 생리활성을 나타내어 실험관계 질환 및 암의 치료 및 예방제로서의 가능성에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다^(21,22). 이 중 포도의 주요 polyphenol 성분인 resveratrol은 포도주의 심혈관계 질환 예방 작용의 주요 효능 물질로 여겨지고 있으며 항산화, 항염증, 암세포 성장 억제 등 다양한 약리 작용이 있는 것으로 알려져 있으므로, 포도로부터 resveratrol을 높은 농도로 함유한 추출물을 확보하여 식품 및 의약품으로 응용하는 데 대하

Table 4. Effect of grape extracts on cancer cell proliferation

Cell line	A549 ¹⁾		Col2 ²⁾	
Sample	% Survival at 50 µg/mL	EC ₅₀ (µg/mL)	% Survival at 50 µg/mL	EC ₅₀ (µg/mL)
Kyho stem	67.1 ± 2.2	>50	72.0 ± 1.2	>50
Kyho seed	70.6 ± 3.4	>50	74.3 ± 0.7	>50
Kyho skin	90.9 ± 3.4	>50	87.6 ± 8.4	>50
Campbell stem	86.3 ± 1.0	>50	91.2 ± 3.4	>50
Campbell seed	76.7 ± 2.5	>50	85.2 ± 2.7	>50
Campbell skin	88.9 ± 1.9	>50	87.4 ± 2.8	>50
Resveratrol	68.2 ± 6.6 ³⁾	>20 ⁵⁾	81.8 ± 1.4 ³⁾	>20 ⁵⁾
Ellipticine	0.0 ± 0.3 ⁴⁾	0.2	0.0 ± 1.3 ⁴⁾	0.8

Human cancer cells were incubated with or without test samples for 72 hr. Cell viability was determined by sulforhodamine B (SRB) dye staining method and calculated relative to DMSO-treated control groups. Data represent mean ± SEM (n=3).

¹⁾A549: Human lung carcinoma.

²⁾Col2: Human colon carcinoma.

³⁾% Survival at 20 µM.

⁴⁾% Survival at 10 µg/mL.

⁵⁾Concentration: µM.

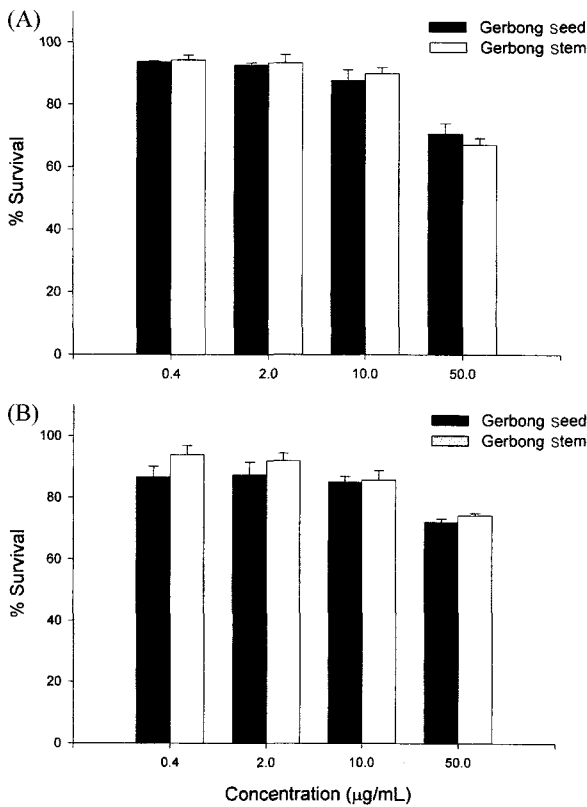


Fig. 4. Effect of Kyho stem and Kyho seed extracts on proliferation of A549 (A) and Col2 (B).

A549 (human lung carcinoma) and Col2 (human colon carcinoma) cells were incubated in the presence or absence of test samples for 72 hr. Then, cells were fixed by 10% TCA and stained with 0.4% SRB solution. Dye was dissolved with Tris base (pH 10), and the absorbance was measured at 515 nm. Cell viability was determined relative to DMSO-treated control groups. Each value represent mean ± SEM (n=3).

여 많은 관심이 주어지고 있다. 본 논문에서는 포도 관련 산업 고도화의 일환으로 기능성 물질의 확보와 가공을 통한 원료의 고부가가치 창출을 목표로 국내에서 생산되는 대표적인

포도종을 중심으로 추출물을 제조하여 약리활성을 평가하고자 하였다. 일차적으로 거봉 및 캠벨 포도의 씨, 줄기 및 껍질 추출물에 대하여 항산화 작용, 염증 관련 인자 생성에 미치는 활성 및 암세포 성장에 대한 영향 등을 resveratrol과 비교하여 평가하였다. ROS는 세포 내 세포막, 단백질 및 DNA의 손상 및 변이를 일으켜 여러 심혈관계 질환, 퇴행성 질환 및 암의 원인이 되는 것으로 알려져 있으므로, 본 논문에서는 ethanol 용액 중에서 안정된 free radical을 형성하는 DPPH를 이용하여 포도 추출물들의 항산화 능력을 평가 하였는데, 포도 추출물 중 거봉줄기, 캠벨줄기, 캠벨씨 및 거봉씨 추출물들이 DPPH free radical을 소거하는 능력을 나타내었고 그 중 거봉씨 추출물은 vitamin C와 효력이 유사하게 나타나 항산화 효능이 우수함을 알 수 있었다. ROS와 더불어 PGs 및 NO와 같은 염증 반응 매개체들도 과다하게 생성될 경우 각종 질환의 원인으로 알려져 있으므로, 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 이용하여 포도 추출물들의 LPS 처리에 의한 PGE₂ 및 NO 생성을 저해하는지를 확인하였으며, 그 결과 거봉줄기, 거봉씨, 및 캠벨씨 추출물이 50 µg/mL에서 PGE₂ 및 NO 생성을 50% 가량 저해하는 효능을 나타내었다. 한편, resveratrol이 암세포 성장을 억제하는 효능을 가지고 있다는 여러 연구 보고에 따라 사람 폐암 및 대장암 세포주를 이용하여 포도 추출물들이 암세포 성장 저해 효과를 나타내는지 확인하였는데 거봉줄기 및 씨 추출물 50 µg/mL에서 30% 정도의 암세포 성장 저해 작용을 나타내었다. 따라서 포도 추출물들은 효과적인 암세포 성장억제 작용을 나타낼 수 있는 자원이므로서 이용 가치가 크다고 할 수 있다. 그러나 포도 추출물들의 항산화 효과와는 달리 염증 반응 매개체 생성 및 암세포 성장 저해 효과는 resveratrol에 비하여 그 활성이 떨어지는 결과가 나왔는데 이는 포도 추출물의 정제가 아직 완전하지 못하여 유효 성분의 세포 내 침투 능력이 resveratrol에 비하여 떨어지기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 유효 추출물들의 정제를 통하여 resveratrol과 유사한 작용을 나타낼 수 있는 추출물의 획득이 이루어질 수 있을 것으로 생각되며, 이에 따라 포도 추출물들은 resveratrol에서 기대되는 항산화, 항염

증 및 암예방 효능을 지닐 수 있는 기능성 식품 및 의약품의 원료로서의 다양하게 이용될 수 있을 것으로 전망된다.

요 약

국내에서 생산된 거봉 및 캠벨 포도의 씨, 줄기 및 껍질 추출물에 대하여 항산화 작용, 염증 관련 인자 생성에 미치는 활성 및 암세포 성장에 대한 영향 등을 resveratrol과 비교하여 평가하였다. 그 결과 포도 추출물 중 거봉줄기, 캠벨 줄기, 캠벨씨 및 거봉씨 추출물들이 항산화 능력을 나타내었고 그 중 거봉씨 추출물은 vitamin C와 효력이 유사하게 나타나 항산화 효능이 우수함을 알 수 있었다. 또한 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 이용하여 포도 추출물들의 LPS 처리에 의한 PGE₂ 및 NO 생성을 저해 여부를 확인한 결과, 거봉줄기, 거봉씨, 및 캠벨씨 추출물이 50 µg/mL에서 PGE₂ 및 NO 생성을 50% 가량 저해하는 효능을 나타내었다. 또한 사람 폐암 및 대장암 세포주를 이용하여 포도 추출물들이 암세포 성장 저해 효과를 나타내는지를 확인하였는데 거봉줄기 및 씨 추출물 50 µg/mL에서 30% 정도의 암세포 성장 저해 작용을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구비 지원으로 수행된 연구결과와 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Lander, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11: 118-124 (1997)
- Patel, R.P., Moellering, D., Murphy-Ullrich, J., Jo, H., Beckman, J.S. and Darley-Usmar, V.M. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1780-1794 (2000)
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B. and Lipsky, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12: 1063-1073 (1998)
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Sci. USA* 90: 7915-7922 (1993)
- Dreher, D. and Junod, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer* 32A: 30-38 (1998)
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Cross, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620 (1992)
- Herschman, H.R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1299: 125-40 (1999)
- Dannenber, A.J., Altorki, N.K., Boyle, J.O., Dang, C., Howe, L.R., Weksler, B.B. and Subbaramaiah, K. Cyclo-oxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2: 544-551 (2001).
- Tsuji, M., Kawano S., Tsujii, S., Sawaoka, H., Hori, M. and Dubois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716 (1998)
- Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beachamp, R.D. and Dubois, R.N. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 58: 362-366 (1998)
- Stuehr, D.J. Mammalian nitric oxide synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411: 217-230 (1999)
- Kroncke, K.D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 113: 147-156 (1998)
- Oshima, H. and Bartsch, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* 305: 253-264 (1994)
- Keloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.E., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Viner, J.L. and Sigman, C.C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J. Nutr.* 130: 467S-471S (2000)
- Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. and Kinsella, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457 (1993)
- Lee, S.K., Mbawambo, Z.H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E.J.C., Metha, R.G., Kinghorn, A.D. and Pezzuto, J.M. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. High Through Screening* 1: 35-46 (1998)
- Martinez, J. and Moreno, J.J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 59: 865-870 (2000)
- Joe, A.K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D. and Weinstein, I.B., Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 8: 893-903 (2002)
- Fremont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66: 663-673 (2000)
- Bhat, K.P.L. and Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957: 210-229 (2002)
- Ferguson, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475: 89-111 (2001)
- Briviba, K., Pan, L. and Rechkemmer, G. Red wine polyphenols inhibit the growth of colon cancer cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J. Nutr.* 132: 2814-8 (2002)

(2002년 10월 22일 접수; 2002년 12월 13일 채택)