

1O_2 으로 유도된 사람 적혈구의 광용혈에 있어서 대두의 아이소플라본인 제니스테인의 보호작용

박 수 남*

서울산업대학교 정밀화학과

Protective Effect of Isoflavone, Genistein from Soybean on Singlet Oxygen Induced Photohemolysis of Human Erythrocytes

Soo Nam Park*

Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Technology

Protective effects of natural components including genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) from *Glycine max* MERRILL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. Genistein (10~100 μ M) suppressed photohemolysis in a concentration-dependent manner, and was more effective than the lipid peroxidation chain blocker, α -tocopherol (Vit. E). Glycoside of genistein, genistin, the water-soluble antioxidant, L-ascorbate, and the iron chelator, myo-inositol hexaphosphoric acid dodecasodium salt (sodium phytate) did not exhibit protective effect against photohemolysis. L-Ascorbate and sodium phytate stimulated photohemolysis at high concentration (500 μ M). α -Carotene 3,3'-diol (lutein), a singlet oxygen (1O_2) quencher, exhibited pronounced protective effect, an indication that 1O_2 is important in photohemolysis sensitized by rose-bengal. Reactive oxygen scavenging activities (OSC₅₀) of natural antioxidants including genistein on reactive oxygen species (ROS) generated in Fe²⁺-EDTA/H₂O₂ system using the luminol-dependent chemiluminescence assay were in the order of sodium phytate > L-ascorbate > α -tocopherol > genistein > genistin. OSC₅₀ value of genistein, genistin, α -tocopherol, L-ascorbate, and sodium phytate were 41.0, 109.0, 9.0, 5.2, and 0.56 μ M respectively. The order of free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀) was L-ascorbate > α -tocopherol > genistein > genistin. These results indicate that genistein can function as an antioxidant in biological systems, particularly skin exposed to solar UV radiation by scavenging 1O_2 and other ROS, and to protect cellular membranes against ROS.

Key words: genistein, *Glycine max* MERRILL, photohemolysis, singlet oxygen, skin photoaging

서 론

피부는 항상 산소와 접촉하고 있고 계속해서 태양 자외선에 노출되게 된다. 따라서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손상 위험은 실질적으로 증가된다. ROS란 1O_2 , H₂O₂와 같은 비라디칼종과 O₂⁻, \cdot OH과 같은 산소중심의 라디칼들 그리고 생체 성분과 ROS와의 반응에서 유래된 ROO \cdot , RO \cdot , ROOH 및 HOCl 등이 포함된다. 이들은 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직중에서 생성될 수 있다. 생체내에서 과잉의 ROS가 생성되면 돌연변이, 세포살상, 발암과 노화, 뿐만 아니라 노화와 관련된 다양한 퇴행성 질환들

이 나타날 수 있다⁽¹⁻³⁾.

광노화는 특히 태양광선에 노출되는 신체 부위에서 자외선에 의해 야기될 수 있다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 ROS가 생성되며 이어서 항산화 방어계는 붕괴된다. 결과적으로 단백질, 지질, DNA와 같은 세포 성분들은 활성산소에 의해 손상을 받게된다⁽⁹⁻¹¹⁾. 이러한 ROS의 생성은 생체내 존재하는 광증감제 분자에 의해 이루어진다⁽¹²⁾. 광증감반응은 Type I 혹은 Type II 형태로 일어나며, Type I 반응의 산물은 라디칼 혹은 라디칼 이온이고, 반면에 Type II 반응은 O₂⁻, \cdot OH, 그리고 1O_2 을 포함하는 ROS를 생성시킨다. 이러한 ROS는 생체내에서 superoxide dismutase (SOD), catalase 혹은 Fe(II) 등의 촉매 작용으로 상호 전환이 가능하다⁽¹³⁻¹⁵⁾.

1O_2 은 수명이 짧은 특히 해로운 분자이며, 주로 광증감반응으로 생성된다. 이 활성산소의 생성은 사람의 백혈구인 호중구 및 호산구에서 확인되었고, 다양한 염증 질환상태에서 정상 조직을 손상시킬 수 있다고 Kanofsky 등은 보고하였다^(6,16). Vile 등도 사람 피부 섬유아세포에 있어서 UVA 의존성

*Corresponding author : Soo Nam Park, Seoul National University of Technology, 172 Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
 Tel: 82-2-970-6451
 Fax: 82-2-972-9585
 E-mail: snpark@snut.ac.kr

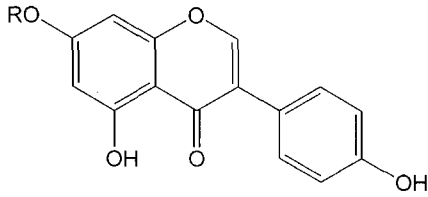


Fig. 1. Chemical structure of genistein (R=H) and genistin (R=glucose).

지질과산화물과 thiobarbituric acid-reactive species (TBARS)의 생성 그리고 단백질 -SH기의 산화에 철과 1O_2 이 포함됨을 밝혔다⁽¹⁷⁾. 1O_2 에 노출된 세포에서 다양한 유전자들이 활성화 되는 것으로 기술되고 있다. Tyrrell 등은 피부 세포에 있어서 UV-A(320~380 nm) 의존성 세포 사멸이나 유전자 활성화에 1O_2 이 포함됨을 밝혔다⁽¹⁸⁾, Scharffetter-Kochanek 등도 사람 피부 섬유아세포에서 1O_2 이 collagenase의 발현을 유발시킨다고 보고했으며, UVA로 유도된 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)의 합성을 1O_2 이 매개할 수 있다고 Wlaschek 등은 보고하였다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 주름생성이 수반되는 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다^(15,19,20). 따라서 1O_2 을 비롯한 ROS는 약물로 유도된 광독성, 포피린증, 그리고 광노화를 포함하는 광으로 인한 피부병 질환에서 심각한 결합조직 손상으로 인한 병발생에 포함된다고 보고되고 있다⁽²¹⁻²³⁾. 그외에도 1O_2 을 포함하는 ROS는 각종 성인병으로 알려진 동맥경화증, 심근경색, 백내장, 당뇨병, 류마티스 관절염, 파킨슨씨병, 암 등의 발병이나 증상을 악화시키는 요인으로 간주되고 있다^(5,6).

Genistein은 대두에 많은 양(1~2 mg/g)으로 존재하는 아이소플라본으로, 일명 식물성 에스트로겐으로 불리우고 있다 (Fig. 1). 아이소플라본은 당잔기의 가수분해후 화학적 구조가 사람의 호르몬인 에스트로겐과 매우 유사할 뿐만 아니라 생리학적으로도 일부 유사한 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 대두에 들어 있는 아이소플라본은 극성 형태의 수용성 배당체인 genistin 등이 주를 이루면서 아글리콘인 genistein 등이 함께 존재한다. 최근에 genistein은 그의 특이적인 tyrosine protein kinase(TPK) 저해작용과 여러 가지 항암 활성 때문에 큰 주목을 끌고 있다⁽²⁴⁻²⁶⁾. 최근에 Ravanti 등은 정상적인 사람 피부 섬유아세포에서 genistein은 kinase와 상호작용함으로써 콜라겐 생성을 자극함을 확인하였다⁽²⁷⁾. 또한 Wang 등은 genistein이 성장인자 수용체 자리에서 kinase를 특이하게 저해함으로써 UVB(290~320 nm)에 의한 전사인자인 activator protein-1(AP-1) 활성화로의 신호전달 과정을 차단시킨다는 보고를 하였다⁽²⁸⁾. 이는 모두 genistein이 tyrosine protein kinase를 저해함으로써 콜라겐 생성을 유도할 수 있는 퍼텐셜이 있음을 나타낸다. 따라서 아이소플라본은 피부노화를 치료하는데 가능성을 가지기 때문에 기능성 식품 및 화장품산업 분야에서도 이에 대한 관심이 일고 있다⁽²⁹⁾.

본 연구에서는 대두의 아이소플라본 성분인 genistein과 그 배당체인 genistin을 대상으로, 피부노화에 있어서 주도적 역할을 하는 1O_2 을 비롯한 ROS에 대한 항산화 활성을 측정하였으며, 특히 사람 적혈구 세포에 있어서 1O_2 으로 유도된 세

포 손상(광용혈 실험)에 대한 이들의 보호작용을 알아보았다. 이와 함께 몇 가지 다른 항산화제들의 작용도 함께 측정하여 genistein의 항산화능을 평가하고, 이 플라보노이드의 활성산소에 대한 세포보호 메커니즘을 논의 하였다. 특히 광용혈 실험은 ROS에 의한 광노화의 실험 모델로 또는 항산화 활성을 갖는 천연물의 평가 및 검색 수단으로서 매우 적합한 점이 많다^(7-8,30). 이 연구에서 genistein은 free radical(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거능이나 활성산소종($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 및 $\cdot OH$) 소거능과는 달리 1O_2 으로 유도된 세포막 파괴(적혈구 용혈)에 있어서, 현저한 보호 작용을 나타냈다. 따라서 genistein의 항산화적 성질에 대하여, ROS 특히 1O_2 에 대항한 실질적인 세포 보호제로서의 가능성을 고찰하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Thermo Spectronic (England)의 Helios beta를 사용하였고, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co.(USA) 제품이였다. 화학발광기는 Berthold사의 6-channel LB9505 LT, HPLC는 Dionex사 제품(UVD170S, P580A LPG), 칼럼은 Higgins Analytical 사의 Hasil HL C18(5 μ m, 250 \times 4.6 mm)를 사용하였다.

Genistein 및 genistin은 Wako Pure Chemical Industries사에서 구입하여 사용하였고, (+)- α -tocopherol(1000 IU/g), L-ascorbic acid, α -carotene-3,3'-diol (lutein), phytic acid dodecasodium salt(myo-inositol hexaphosphoric acid dodecasodium salt, sodium phytate), heparin, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate(EDTA), 증감제로 사용된 rosebengal, 화학발광에 사용한 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol), free radical 소거활성에 사용한 DPPH는 모두 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei 사 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemicals & Metals 사 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl 그리고 에탄올, 메탄올 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. Genistein 및 genistin의 순도는 HPLC에서 단일 피크임을 확인하였고[용매조건; (A) 0.1% 빙초산 수용액, (B) 0.1% 빙초산 아세트나이트릴 용액, B의 용매 비율을 15~55%/100분, 용리 시간; genistein 31분, genistin 17분]⁽³¹⁾, 실험에 사용한 농도는 각 화합물의 최대 흡수파장에서의 몰흡광계수를 이용하여 UV-visible 분광기로 확인한 후 결정하였다.

광용혈 실험

적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남자로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer(pH 7.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4°C의 냉

장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12시간 이내에 행하였다.

광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이 때 적혈구 수는 0.5×10^7 cells/mL이었다⁽⁷⁾.

플라보노이드를 포함한 몇가지 천연물의 광용혈 억제효과

1.5×10^7 cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가 하였다. 플라보노이드는 에탄올에 녹인 0.8, 2.0, 4.0 및 8.0 mM 용액을 각각 50 μ L 씩 첨가하였다. 암소에서 30분간 pre-incubation 시킨 후, 광증감제로 rose-bengal(12 μ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film)으로 입구를 봉한 후 15분 광조사하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm \times 20 cm \times 25 cm 크기의 상자안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15분 광을 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation)에 의한 적혈구의 파괴정도를 15분 간격으로 700 nm에서 투광도(%transmittance)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20°C 항온실에서 행하였다. Genistein을 비롯한 항산화제들의 광용혈에 미치는 효과는 광조사후 암반응 시간에 따른 용혈 정도를 나타낸 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ_{50} 이 32분으로 오차 범위 ± 1 분내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120분까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다.

Luminol 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS(O₂⁻, H₂O₂ 및 \cdot OH)와 luminol의 반응에 의한 화학발광(420~450 nm)을 이용하여 genistein, genistin, (+)- α -tocopherol, L-ascorbic acid(중성 pH에서 음으로 하전된다. 따라서 L-ascorbate로 명칭함) 및 sodium phytate의 활성산소 소거활성을 측정하였다⁽³²⁻³⁴⁾. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1 mL를 넣고 0.8, 2.0, 4.0 및 8.0 mM의 플라보노이드 용액 혹은 비교 시료용액을 50 μ L 취하여 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μ L 및 5 mM FeCl₃ \cdot 6H₂O 10 μ L를 가한후 35 mM luminol 80 μ L를 넣고 흔들어 섞어 준 다음, 증류수를 가하여 1960 μ L가 되도록 하였다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5분간 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 μ L 넣고 화학발광을 25분간 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 과산화수소와 철 이온이 들어있지 않은 것으로 하였다. 반응용액 중의 각 시약의 농도는 다음과 같다. [FeCl₃ \cdot 6H₂O] = 25 μ M, [EDTA] = 50 μ M, [H₂O₂] = 3 mM, [luminol] = 1.4 mM.

화학발광기는 6-channel LB9505 LT의 각 채널을 실험전에

보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광 측정 지해 정도는 아래의 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광이 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen scavenging activity, OSC₅₀, μ M)로서 표기하였다.

$$\% \text{저해율} = \frac{\text{control의 cpm} - \text{sample의 cpm}}{\text{control의 cpm} - \text{blank의 cpm}} \times 100$$

DPPH법을 이용한 free radical 소거 활성

콩의 아이소플라본인 genistein 및 genistin 그리고 비교 표준 물질인 (+)- α -tocopherol과 L-ascorbate의 free radical 소거활성을 측정하였다. 측정에는 유기 free radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil(DPPH)을 이용하였다⁽³⁵⁾. 실험방법은 0.2 mM DPPH 메탄올 용액 0.5 mL에 여러 농도의 시료용액 1 mL를 첨가하고 섞은 다음 실온에서 10분간 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 DPPH(66.7 μ M)의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, μ M)로서 표기하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 student's t-test를 행하였다.

결 과

로즈벵갈로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 genistein 및 몇 가지 항산화제의 보호작용

로즈벵갈 존재하에서 사람 적혈구 현탁액에 15 min간의 광조사후, 'O₂으로 유도된 용혈 정도를 암반응 시간에 따라 측정하였다. 대조군의 경우는 적혈구 세포가 50% 용혈되는데 걸리는 시간(τ_{50})은 32분으로 나타났다. 로즈벵갈없이 광조사만을 한 경우나 광조사없이 로즈벵갈만 현탁액에 들어 있는 경우는 암반응 시간 120분까지 용혈 현상은 볼 수 없었다. Genistein 및 genistin을 비롯한 몇 가지 화합물들의 용혈억제효과를 측정한 결과가 Fig. 2 및 Table 1에 나와 있다. 플라보노이드 아글리콘인 genistein은 μ M의 농도 범위(10~100 μ M)에서 농도-의존적으로 용혈을 억제하였다. Genistein은 10 μ M의 낮은 농도에서도 뚜렷한 용혈 억제효과를 볼 수 있으며(τ_{50} =45분) 농도 증가와 더불어 그 효과가 증가함을 보여 주고 있다. 즉 광조사 후 암반응 시간에 따른 용혈 정도를 측정한 결과 10 μ M에서는 τ_{50} 이 45분을 비롯하여, 25, 50 및 100 μ M에서 각각 62, 98 및 150분으로 나타났다. 그러나 genistein의 배당체인 genistin은 25, 50 및 100 μ M의 농도에서 τ_{50} 이 각각 31, 31 및 32분으로, 농도에 따른 차이가 없는, 대조군과 거의 비슷한 결과를 나타내었다. 다시 말하면 genistin은 100 μ M의 농도에서도 광용혈에 대한 세포막 보호효과를 전혀 나타내지 않았다.

비교물질로 사용한 지질 과산화 연쇄반응의 차단제로 알려진 지용성 항산화제, (+)- α -tocopherol은 10~100 μ M의 농도 범위에서 농도-의존적으로 광용혈을 억제하였다. 세포막 보호 효과는 10, 25, 50 및 100 μ M의 농도에서 τ_{50} 은 각각 34,

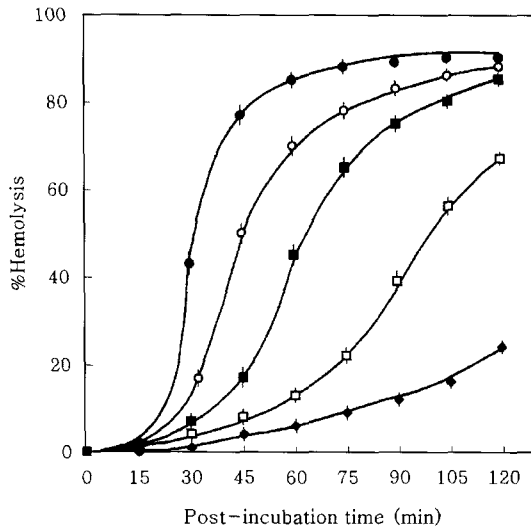


Fig. 2. Dose effect of genistein on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

Irradiation time: 15 min, preincubation time: 30 min, [rose-bengal] = 1.5 μM, concentrations of genistein; ●-●: control, ○-○: 10 μM, ■-■: 25 μM, □-□: 50 μM, ◆-◆: 100 μM.

40, 58 및 76분을 나타내었다. 한편 수용성 항산화제인 L-ascorbate는 50 및 100 μM에서는 본 실험 조건에서 적혈구 광용혈에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 그러나 500 μM에서는 약간 광용혈을 촉진하였다. 또 다른 지용성 항산화제이자 ¹O₂의 효율적인 소광제로 알려진 lutein은 Table 1에서 보는 바와 같이 적혈구 광용혈을 효과적으로 억제하였다. Lutein은 0.5, 2.5 및 12.5 μM의 농도에서 농도-의존적으로 세포막 보호작용을 나타내었으며, 각각의 농도에서 τ₅₀은 38, 61 및 109분이었다. 특히 lutein은 5 × 10⁻⁷ M의 매우 낮은 농도에서도 그 효과가 뚜렷함을 알 수 있다. Lutein의 이러한 현저한 광용혈 억제작용은 로즈벵갈에 의한 적혈구 광용혈이 바로 ¹O₂에 의하여 개시됨을 시사한다. 한편, 광용혈에 있어서 철이온과 같은 전이금속의 영향을 조사하기 킬레이트제인 sodium phytate의 효과를 측정하였다. Sodium phytate는 50 μM 농도 이하에서는 광용혈에 대한 효과를 보이지 않았다. 500 μM의 농도에서는 대조군과 비교하여 광용혈을 오히려 촉진시키는 것으로 나타났다(τ₅₀ = 25분).

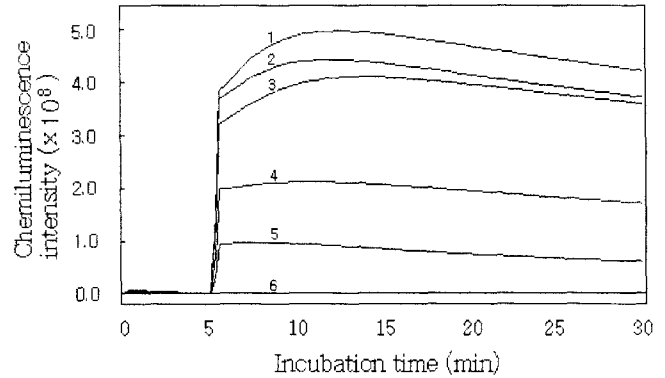


Fig. 3. Reactive oxygen scavenging activity of genistein in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

[FeCl₃ · 6H₂O]=25 μM, [EDTA]=50 μM, [H₂O₂]=3 mM, [luminol]=1.4 mM, concentrations of genistein; 1: control, 2: 2.0 μM, 3: 10 μM, 4: 50 μM, 5: 100 μM, 6: blank.

Luminol 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성

Fig. 3은 luminol 발광법을 이용하여, genistein의 농도에 따른 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS의 소거작용을 나타낸 것이다. Genistein은 농도-의존적으로 화학발광을 감소시켰다. 즉, 농도-의존적으로 활성산소 소거활성을 나타내었다. Genistein의 2, 10, 50 및 100 μM에서 ROS를 각각 11, 16, 58 및 83% 소거시켰다. 이로부터 활성산소 50%를 소거하는데 필요한 시료의 농도인, 활성산소 소거활성(reactive oxygen scavenging activity, OSC₅₀)은 41.0 μM로 구해졌다(Table 2). 한편 genistein의 배당체인 genistin의 OSC₅₀은 109.0 μM로, genistein이 genistin보다도 두배 이상 활성산소 소거활성이 크게 나타났다. 한편 비교물질로 사용한 지용성 항산화제 (+)-α-tocopherol의 OSC₅₀은 9.0 μM이었고, 수용성 항산화제인 L-ascorbate는 5.2 μM을 나타내었다. 따라서 활성산소 소거활성은 L-ascorbate > (+)-α-tocopherol > genistein > genistin순이었다.

많은 종류의 곡류 및 콩 등에 함유되어 있는 성분으로 강력한 철 킬레이트제이자, 철의 촉매활성을 불활성화시키는 것으로 알려진 sodium phytate는 0.56 μM을 나타내었다. 한편 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 EDTA를 더 첨가할 경우 EDTA의

Table 1. Effects of flavonoids and reference compounds on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes

(Concentration, μM)	τ ₅₀ (Half-time of hemolysis) ¹⁾						
	0.5	2.5	10	25	50	100	500
Genistein ²⁾			45	62	98	150	-
Genistin ³⁾			-	31	31	32	-
References							
(+)-α-Tocopherol			34	40	58	76	
L-Ascorbate			-	-	32	32	29
Lutein ⁴⁾	38	61	109 ⁵⁾	-	-	-	-
Sodium phytate ⁶⁾			-	-	32	31	25

¹⁾Control, τ₅₀ = 32 min, ²⁾4',5,7-trihydroxyisoflavone, ³⁾genistein-7-glucoside, ⁴⁾α-carotene 3,3'-diol, ⁵⁾12.5 μM, ⁶⁾sodium phytate: phytic acid dodecasodium salt.

Table 2. Reactive oxygen scavenging activities of genistein, genistin, and reference compounds in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol- dependent chemiluminescence assay

Compounds	Scavenging activity
	(OSC ₅₀ , μM) ¹⁾
Flavonoids	
Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)	41.0
Genistin (genistein-7-glucoside)	109.0
References	
(+)-α-Tocopherol	9.0
L-Ascorbate	5.2
Sodium phytate	0.56
EDTA ²⁾	40.0

¹⁾OSC₅₀: reactive oxygen (O₂⁻, ·OH and H₂O₂) scavenging activity, EDTA²⁾: ethylenediaminetetraacetic acid.

OSC₅₀은 40.0 μM을 나타내었다(Table 2). 하지만 본 실험 조건에서 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계를 완전히 불활성화시키는데 필요한 EDTA의 농도는 반응계 EDTA 농도를 포함하여 550 μM이었다(본 실험결과).

한편, Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 존재할 수 있는 ROS는 O₂⁻, ·OH 및 H₂O₂으로, 이 계에서 O₂의 생성이나 존재는 확인되지 않았다. Luminol은 이들 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420~450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다.⁽³²⁻³⁴⁾ 실험에 사용한 genistein을 비롯한 항산화제들의 UV-visible 흡수 스펙트럼은 luminol의 발광 파장과는 겹치지 않는다. 따라서 시료용액에 의한 발광 파장의 재흡수 문제는 없었다.

DPPH법을 이용한 free radical 소거 활성

Genistein, genistin, (+)-α-tocopherol 및 L-ascorbate의 free radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. Genistein의 free radical 소거활성(FSC₅₀)은 6,500 μM로 나타났고, 그 배당체인 genistin은 >7,000 μM이었다. Genistin은 물론이고, genistein은 free radical 소거활성이 매우 낮음을 알 수 있다(Table 3).

한편 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol은 FSC₅₀이 13.4 μM이고 L-ascorbate는 8.4 μM로서, Table 2의 활성산소 소거활성에서 보여준 바와 같이 L-ascorbate가 (+)-α-tocopherol보다도 활성산소 소거활성 및 free radical 소거활성이 모두 크게 나타났다. DPPH 법을 이용한 free radical 소거활성의 크기는 L-ascorbate > (+)-α-tocopherol > genistein > genistin 순으로 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서의 활성산소 소거활성과 유사한 패턴을 나타내었지만, genistein의 활성산소 소거활성(OSC₅₀) 41.0 μM과 비교할 때 free radical 소거활성(6,500 μM)이 매우 작음을 알 수 있다.

L-Ascorbate는 활성산소 소거활성(5.2 μM)이나 free radical 소거활성(8.4 μM)이 매우 크에도 불구하고 500 μM까지의 농도에서 광용혈을 전혀 억제하지 못했다. 그 다음으로 활성산소 및 free radical 소거활성이 큰 (+)-α-tocopherol은 10~100 μM 농도에서 농도-의존적으로 세포보호 효과를 나타냈다. Genistein은 free radical 소거활성은 거의 없지만, 광용혈

에서는 50 및 100 μM의 농도에서 (+)-α-tocopherol보다 거의 2배 가까운 세포 보호효과를 나타내었다.

고 찰

피부에서 ROS의 생성은 광증감제 분자에 의한 자외선의 흡수로 시작된다. 광증감반응의 주 생성물은 반응성이 매우 큰 O₂⁻을 비롯하여 O₂⁻, H₂O₂, ·OH 등을 포함한다. SOD는 O₂⁻을 H₂O₂로 전환시킨다. H₂O₂는 수명이 길고 세포막들을 쉽게 통과하여 이동할 수 있다. O₂⁻와 H₂O₂는 반응성이 약하여 직접적으로 조직손상에 참여하는 경우는 드물지만 ·OH과 같은 반응성이 매우 큰 라디칼종의 생성에 참여한다. 다시 말해, O₂⁻은 Fe(III)와 같은 전이금속을 환원시킬 수 있고, 환원된 Fe(II)은 과산화수소를 환원시켜 ·OH을 생성시킨다⁽¹⁵⁾. 태양 자외선에 피부가 노출되면 노출부위에 철 수준이 증가한다^(36,37). 또한 땀에도 라디칼 반응을 촉매할 수 있는 철 및 구리와 같은 전이금속이 풍부하다⁽³⁸⁾. 따라서 Fenton 반응에 의해 ·OH이 생성될 수 있다. 결과적으로 O₂과 ·OH은 광손상에 있어서 중요한 역할을 한다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속화시킨다⁽⁸⁾.

적혈구를 이용한 광용혈 실험은 ROS에 의한 광노화(특히 세포 손상)의 실험 모델로 또는 세포 수준에서 항산화 활성을 갖는 천연물의 평가 및 검색 수단으로서 매우 적합한 점이 많다^(7,8). 이 연구에서는 광증감제로 로즈벵갈을 사용하여 ROS(주로 O₂)을 발생시켰다. O₂는 적혈구 세포막의 지질 과산화반응을 일으키고, 막단백질의 산화, 구조 단백질의 절단, 막 투과성의 변질, 막과 관련된 효소에 대한 영향, 이온 전달의 변화, 지질과산화물로부터 2차 라디칼의 생성, O₂⁻와 H₂O₂ 그리고 헤모글로빈에서 방출된 철과의 Fenton 반응으로 ·OH을 생성시킬 수 있다. 결국 O₂으로 개시된 적혈구막의 손상은 적혈구의 용혈로 이어진다.

O₂으로 유도된 적혈구의 광용혈에 있어서 genistein은 μM의 농도 범위(10~100 μM)에서 농도-의존적으로 용혈을 억제하였다. Genistein은 10 μM의 낮은 농도에서도 뚜렷한 용혈 억제효과를 나타내었으며(τ₅₀=45분), 25, 50 및 100 μM에서 τ₅₀은 각각 62, 98 및 150분이었다. 그러나 genistein의 배당체인 genistin은 25~100 μM의 농도에서 τ₅₀이 31~32분으로, 농도에 따른 차이가 없이 대조군과 거의 비슷하였다. 따라서 genistin은 O₂으로 유도된 광용혈에 대한 세포막 보호효과를 전혀 나타내지 않았다(Fig. 2, Table 1).

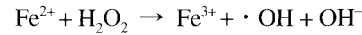
Genistein의 항산화능을 비교하기 위해, 지용성 항산화제로서 (+)-α-tocopherol과 lutein 그리고 수용성 항산화제로 L-ascorbate가 광용혈 억제작용이 있는지 측정하였다. (+)-α-Tocopherol은 10~100 μM의 농도 범위에서 농도-의존적으로 광용혈을 억제하였다. α-Tocopherol은 지용성이 높기 때문에 지질 과산화반응의 현상이라고 할 수 있는 세포막 또는 세포 소기관의 막에 분포되어있는 것이 특징이다. 막에 분포한 비타민 E는 국부적으로 생긴 활성산소에 의한 지질 과산화반응의 연쇄반응을 효율적으로 차단시킨다. 특히 α-tocopherol

은 광증감 반응에 의해 생성된 ¹O₂을 효율적으로 제거할 수 있다. 피리딘 용액에서 α-tocopherol의 ¹O₂ 소광 속도상수(k_p)는 2.5×10⁸ M⁻¹S⁻¹이고, α-tocopherol과 ¹O₂과의 화학적 반응 속도상수(k_r)는 2×10⁶ M⁻¹S⁻¹임이 밝혀졌고, 따라서 α-tocopherol은 자신이 파괴되기 전에 약 120개의 ¹O₂ 분자를 불활성화시키는 것으로 알려져 있다⁽³⁹⁾. 한편 수용성 항산화제(비타민 C)인 L-ascorbate는 50 및 100 μM에서는 본 실험 조건에서 적혈구 광용혈에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 그러나 500 μM에서는 약간 광용혈을 촉진하였다. 생체내에서 비타민 C는 ·OH이나 HOCl 등의 활성산소를 용이하게 제거할 수 있다. 본 연구에서는 적혈구 광용혈에서와 같은 saline-phosphate buffer(pH 7.4)에 L-ascorbate 500 μM, 로즈벵갈 1.5 μM이 되도록 첨가한후 15 min간 광조사를 했을 때, L-ascorbate의 농도는 500 μM에서 355 μM로 29% 감소되었다. 로즈벵갈없이 광조사만 한 경우는 6.7% 감소하였다(본문에 자료는 제시하지 않았음). 이는 ascorbate의 광산화에 의한 파괴가 주로 ¹O₂에 기인된 것으로, ascorbate가 바로 효율적인 ¹O₂ 소거제임을 시사하는 것이다. 그러나 ¹O₂으로 유도된 광용혈에서는 수용성 항산화제인 ascorbate는 전혀 효과가 없었고 오히려 높은 농도에서는 용혈을 촉진시켰다. Ascorbate의 이와 같은 용혈 촉진 작용은, 적혈구막에 있어서 uroporphyrin에 의한 지질과산화반응에서 비교적 낮은 농도(예, 500 μM)의 ascorbate는 산화반응과 용혈을 증가시키는 산화제로 작용하고 상대적으로 높은 농도(예, 15 mM)에서는 그 과정들을 저해하는 항산화제로 작용한다는 Girotti 등의 연구결과와도 일치한다⁽⁴⁰⁾. 이러한 선구산화제로서의 작용은 Fe(III)이 ascorbate에 의해 Fe(II)로 환원되고 이어서 Fe(II)이 과산화물과 반응하여 알록실 라디칼, 퍼옥실 라디칼 등의 생성을 통하여 나타날 수 있다. 한편, 다른 지용성 항산화제인 lutein은 0.5~12.5 μM의 농도에서 농도-의존적으로 세포 보호 작용을 나타내었으며, 12.5 μM에서 τ₅₀은 109분을 나타내었다. Lutein과 같은 카로티노이드는 매우 효율적인 ¹O₂의 소광제로 알려져 있다. 카로티노이드의 ¹O₂ 소광 속도상수는 ~10¹⁰ M⁻¹S⁻¹의 범위이며, 카로티노이드 한 분자당 화학적 반응없이 1000개의 ¹O₂을 제거하는 것으로 알려져 있다⁽⁸⁾. Lutein의 이러한 현저한 세포 보호 작용은 적혈구 광용혈이 바로 ¹O₂에 의하여 주도적으로 개시되며, 수용성인 ascorbate와는 달리 지용성인 α-tocopherol과 lutein의 세포막에서의 항산화능이 용혈 억제에 매우 중요함을 시사한다. 이들 항산화제들과 비교해 볼 때 genistein의 ¹O₂으로부터의 현저한 세포 보호작용은 시사하는 바가 크다고 사료된다. 앞으로 세포막에서 genistein의 ¹O₂과의 반응성 등에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다(Fig. 2, Table 1).

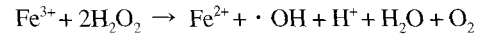
광용혈에 있어서 철이온과 같은 전이금속의 영향을 조사하기 위하여 강력한 킬레이트제인 sodium phytate의 효과를 측정하였다. Sodium phytate는 50 μM 농도 이하에서는 광용혈에 대한 효과를 보이지 않았다. 500 μM의 농도에서는 대조군과 비교하여 광용혈을 다소 촉진시키는 것(τ₅₀=25분)으로 나타났다. 따라서 수용성의 킬레이트제는 광용혈에서 보호효과를 나타내지 않았다. 이는 광용혈에 철의 촉매 작용이 크게 기여하지 않든지 그렇지 않으면 세포막 혹은 세포 안쪽에서 일어나는 과정에 킬레이트제가 참여할 수 없기 때문

인지는 더 연구해볼 필요가 있다고 하겠다.

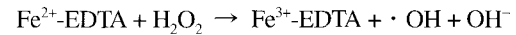
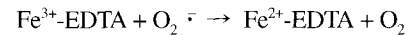
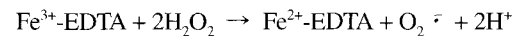
생명체에 대한 O₂·와 H₂O₂의 독성 작용은 철 이온 의존성 ·OH의 생성에 기인된다고 제안되고 있다. 생체계에 있어서 ·OH을 생성시키는 주요 반응은 다음과 같은 Fenton 반응으로 알려져 있다.



그러나 Fe³⁺염과 H₂O₂와의 반응으로도 ·OH이 생성될 수 있다고 보고되고 있다.



특히 Fe³⁺-EDTA를 H₂O₂와 항온배양시키면 ·OH이 생성되는데 이때 SOD를 첨가할 경우 ·OH 생성의 거의 완벽하게 저해되는 것으로부터 다음과 같은 일련의 반응과정들을 통하여 ·OH이 생성되는 것으로 받아들여지고 있다⁽³²⁾.



따라서 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 존재할 수 있는 ROS는 O₂·⁻, H₂O₂ 및 ·OH이다. Luminol은 이들 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광을 하는 것으로 알려져 있다⁽³²⁻³⁴⁾.

Fig. 3에서와 같이, luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 발생시킨 활성산소에 대하여, genistein은 농도-의존적으로 활성산소 소거활성을 나타내었다. 즉, 2, 10, 50 및 100 μM에서 ROS를 각각 11, 16, 58 및 83% 소거시켰다. 따라서 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 41.0 μM로 구해졌다(Table 2). 한편 배당체인 genistin의 OSC₅₀은 109 μM로, genistein이 genistin보다도 두배 이상 활성산소 소거활성이 크게 나타났다. 한편 비교물질인 (+)-α-tocopherol, L-ascorbate 및 sodium phytate의 OSC₅₀은 각각 9.0, 5.2 및 0.56 μM이었다. 따라서 활성산소 소거활성은 sodium phytate >> L-ascorbate > (+)-α-tocopherol >> genistein > genistin 순이었다. 한편 광용혈 실험에서 세포 보호 활성은 genistein >> (+)-α-tocopherol >> genistin ≈ L-ascorbate, sodium phytate 순이었다. L-Ascorbate는 활성산소 소거활성(OSC₅₀=5.2 μM)이 매우 کم에도 불구하고 ¹O₂으로 유도된 세포막 손상에서 보호작용을 전혀 나타내지 못했다. (+)-α-Tocopherol도 활성산소 소거활성은 genistein보다도 4배 이상 크지만 ¹O₂에 대항한 세포막 보호 활성은 오히려 훨씬 작게 나왔다(Table 1). Sodium phytate는 활성산소 소거활성이 가장 کم에도 불구하고(사실은 활성산소를 소거하는 것이 아니라 킬레이트 작용에 의하여 철의 촉매 작용을 불활성화시킴으로써 활성산소의 생성을 차단시킴) ascorbate와 마찬가지로 용혈 억제 효과는 전혀 없었고, 500 μM에서는 ascorbate보다도 용혈을 더 촉진시키는 것으로 나타났다(Table 1).

한편 ROS 발생계(Fe³⁺-EDTA/H₂O₂)로 사용한 EDTA는 그 계에 더 첨가될 때 OSC₅₀이 40.0 μM이었고, Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계를 완전히 불활성화시키는데 필요한 EDTA의 농도는 반응계를 포함하여 550 μM이었다(본 실험에서). 이 EDTA의 농도를 %농도로 환산하면 0.02%로 계산되었다. 따라서 Table

2에서와 같이 본 실험 조건에서 OSC₅₀ 기준으로, phytate는 킬레이트 활성이 EDTA보다도 70배 이상 큼을 알 수 있다. 이러한 관찰들은 몇가지 중요한 의미를 가질 수 있다. 예를 들면, 철-EDTA 킬레이트에 의한 철로 매개된 ·OH의 생성 용이성의 관점에서 볼 때, 화장품에서의 제품 안정화제로 또는 효소 및 식품의 방부제로 EDTA의 사용을 다시 한번 고려해 보는 것이 현명할 수 있다. 많은 종류의 곡류 및 콩 등을 포함하는 모든 식물의 씨앗에 무거운 중량당 1~6% 함유되어 있는 myo-inositol hexaphosphate인 phytate로 EDTA를 대체할 수 있다. 씨앗에서 phytic acid의 주 기능은 저장동안 산화적 손상에 대한 보호작용으로 믿어지고 있다. 사실, 철-phytate 킬레이트는 Fenton 반응에서 전적으로 불활성이다. 이러한 특성은 신선한 과일이나 야채의 방부에 성공적으로 응용한 사례가 보고되고 있다⁽⁴¹⁾.

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. α-토코페롤 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소주게로 작용하여 연쇄반응을 종결시키는 작용을 한다. 이 때 수소주게로 작용하는 항산화제의 능력은 비교적 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다. Genistein, genistin, (+)-α-tocopherol 및 L-ascorbate의 free radical(DPPH) 소거활성을 측정할 결과는 Table 3과 같다. Genistein 및 genistin의 free radical 소거활성(FSC₅₀)은 각각 6,500 및 >7,000 μM이었다. Genistin뿐만 아니라, genistein도 free radical 소거활성은 매우 낮음을 알 수 있다. 한편, (+)-α-tocopherol 및 L-ascorbate는 FSC₅₀가 각각 13.4, 8.4 μM로서, Table 2의 활성산소 소거활성에서 보여준 바와 같이 L-ascorbate가 (+)-α-tocopherol보다도 활성산소종 소거활성 및 free radical 소거활성이 모두 크게 나타났다. Free radical 소거활성의 크기는 L-ascorbate > (+)-α-tocopherol > genistein > genistin 순으로 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서의 활성산소 소거활성과 유사한 패턴을 나타내었지만, genistein의 활성산소 소거활성(41.0 μM)에 비해 free radical 소거활성(6,500 μM)이 매우 낮음을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합해 보면, 'O₂ 소광제인 lutein의 현저한 용혈 억제작용으로부터, 로즈벵갈의 광증감반응에 의한 적혈구 광용혈은 'O₂이 주 활성종임을 시사한다(Table 1), Genistein은 활성산소 소거활성이나 free radical 소거활성은 ascorbate나 α-tocopherol보다도 훨씬 작지만 'O₂으로 유도된 세포손상에서 이들과 비교하여 매우 큰 세포 보호 활성을 나타내었다(Table 1, Fig. 2). 또한 genistein은 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS에 대해서도 비교적 높은 소거활성(OSC₅₀ = 41.0 μM)을 나타내었다. 보다 지용성에 가까운 genistein의 현저한 용혈 억제 효과는 적혈구 막 또는 표면의 지질 이분자층에의 가용화에 의한 것으로 보인다. 논의한 것처럼 genistein은 광증감반응으로 생성된 'O₂ 또는 세포막의 산화적 분해가 일어나는 동안 발생하는 ROS의 소거제로 작용할 수 있으며 이러한 과정에서 세포막을 보호하는 것으로 사료된다.

한편, 콜라겐의 생성과 분해에 대한 기초지식은 피부노화, 특히 주름을 치료하는데 있어서 중요하다. 콜라겐의 down-regulation에 관여하는 2개의 전사인자인 AP-1과 nuclear fac-

Table 3. Free radical scavenging activities of genistein, genistin, and reference compounds using DPPH method

Compounds	Scavenging activity
	(FSC ₅₀ , μM) ¹⁾
Flavonoids	
Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)	6,500
Genistin (Genistein-7-glucoside)	>7,000
References	
(+)-α-Tocopherol	13.4
L-Ascorbate	8.4

¹⁾FSC₅₀: free radical (DPPH) scavenging activity.

tor kappa B(NF-κB)는 자외선과 'O₂을 비롯한 ROS에 의해 유발되는 것으로 보고되고 있다^(15,29,42,43). AP-1은 직접적으로 콜라겐 발현을 억제시킨다. AP-1과 NF-κB는 모두 matrix metalloproteinase(MMP) 유전자를 발현시킴으로써 콜라겐을 감소시킨다. AP-1과 NF-κB의 활성화 과정에 tyrosine protein kinase(TPK)가 관여한다. Genistein은 바로 TPK의 저해제로 잘 알려져 있다^(24,28). 특정한 암세포의 경우로, genistein은 MMPs의 발현을 down-regulation하고 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)는 up-regulation하는 것으로 알려져 있다^(44,45). 피부의 광노화 과정에서도 MMPs와 TIMP 조절은 매우 중요하다⁽¹⁵⁾.

그외에 최근 genistein의 항산화 작용에 관한 연구들이 몇 가지 보고되고 있다. DNA에 있어서 자외선으로 유도된 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG, 활성산소에 의해 생성되는 것으로 알려져 있음)의 생성, 그리고 8-methoxy-psoralen과 UV-A(PUVA, 피부 건선 치료제로 알려짐)로 유도된 8-OHdG 생성을 genistein이 효율적으로 저해했으며 이때 DNA의 산화적 손상에 'O₂이 주 활성종이라고 Wei 등은 제안하였다. 또한 Trieu 등은 'O₂으로 유도된 cerebral stroke 쥐의 *in vivo* 모델에 있어서 genistein이 다른 항산화제들보다도 효과적임을 보고하고, 이는 ROS로 야기되는 cerebral stroke이나 다양한 질병을 예방하는데 genistein이 유용할 수 있다는 실험적 증거를 제시하였다. Orié 등은 인슐린-비의존성 당뇨병 환자의 림파구에 있어서 formyl-Met-Leu-Phenylalanine (fMLP)에 의한 ROS 생성이 genistein에 의해 저해되었음을 보고하였다⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾.

이러한 측면에서 볼 때, 생체내에서 'O₂을 비롯한 ROS 부하를 감소시키는 일은 활성산소로 야기되는 질환이나 노화 특히 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다. 이미 genistein은 tyrosine protein kinase의 저해제로 잘 알려져 있으며, 본 연구에서도 'O₂으로 유도된 적혈구 광용혈에서의 세포 보호작용, 활성산소(O₂⁻, H₂O₂ 및 ·OH) 소거작용에서 큰 활성을 보여주었다. 그러므로 genistein은 활성산소와 관련된 질환을 예방하고 치료하는데 혹은 피부노화 방지, 특히 피부 주름을 개선시키는데 큰 퍼텐셜을 가질 수 있다고 사료된다. 따라서 genistein은 그의 특이적이고 다양한 항산화 활성으로 볼 때 건강 기능성식품이나 기능성화장품에 응용이 기대되는 기능성 소재라고 사료된다.

요 약

자외선에 노출된 피부에서 생성된 활성산소종에 의한 산화적 스트레스는 세포 구성 성분들을 손상시키고 궁극적으로는 피부 광노화 및 발암을 야기시킬 수 있다. 이 연구에서는 대두(*Glycine max* MERRILL)의 성분인 genistein(4',5,7-trihydroxyisoflavone)을 포함하는 몇 가지 천연 항산화제들에 대하여 로즈벵갈로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 보호 효과를 조사하였다. Genistein(10~100 μM)은 농도-의존적으로 광용혈을 억제하였다. 그리고 지질 과산화 연쇄반응의 차단제인 α-tocopherol보다도 더 효과적이었다. 그러나, Genistein의 배당체인 genistin, 수용성 항산화제인 L-ascorbate, 철-킬레이트제인 sodium phytate는 광용혈에 대하여 보호 효과를 나타내지 않았다. 오히려 보다 높은 농도(500 μM)에서는 L-ascorbate와 sodium phytate 모두 광용혈을 촉진시켰다. 반면, ¹O₂ 소광제로 알려진, α-carotene 3,3'-diol은 현저한 보호 효과를 보여주었다. 이 결과는 로즈벵갈로 증감된 광용혈에 있어서 ¹O₂이 중요함을 가리킨다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용하여, Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 ROS에 대한 몇 가지 천연 항산화제들의 ROS 소거활성을 측정하였다. 활성산소 소거활성(OSC₅₀)의 크기는 sodium phytate > L-ascorbate > (+)-α-tocopherol > genistein > genistin순이었다. Genistein, genistin, α-tocopherol, L-ascorbate 및 sodium phytate의 활성산소 소거활성(OSC₅₀)은 각각 41.0, 109.0, 9.0, 5.2, 및 0.56 μM이었다. Free radical 소거활성(FSC₅₀)의 크기는 L-ascorbate > α-tocopherol >> genistein > genistin순으로 나타났다. 이상의 결과들은 genistein이 ¹O₂ 혹은 다른 ROS를 소거함으로써 그리고 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리킨다.

감사의 글

이 논문은 (주)바이오랜드의 학술연구비 지원으로 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Cadenas, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 79-110 (1989)
2. Fantone, J.C. and Ward, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction. *Ann. J. Path.* 107: 397-418 (1982)
3. Steinbeck, M.J., Khan, A.U. and Karnovsky, M.J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* 267: 13425-13433 (1992)
4. Foote, C.S. Photosensitized oxidation and singlet oxygen; consequences in biological systems. In: *Free Radical in Biology*. Pryor, W.A. (ed.). Academic press, New York, USA (1976)
5. Packer, L. Oxidative stress, antioxidant, aging and disease, pp. 1-14. In: *Oxidative Stress and Aging*. Cutler, R.G., Packer, L., Bertram, J. and Mori, A. (eds.). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland (1995)
6. Pincemail, J. Free radicals and antioxidants in human diseases, pp. 83-98. In: *Analysis of Free Radicals in Biology Systems*.

- Favier, A.E., Cadet, J., Kalyanaraman, B., Fontecave, M. and Pierre, J.-L. (eds.). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland (1995)
7. Park, S.N. Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions. Ph.D. Dissertation, Seoul National University, Seoul, Korea (1989)
8. Park, S.N. Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cos. Sci. Kor.* 23: 75-132 (1997)
9. Jurkiewicz, B.A. and Buettner, G.R. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: An electron paramagnetic resonance study. *Photochem. Photobiol.* 59: 1-4 (1994)
10. Packer, L. Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, pp. 239-253 In: *Free Radical Damage and Its Control*. Rice-Evans, C.A. and Burdon, R.H. (eds.). Elsevier Science, St. Louis, MO, USA (1994)
11. Jurkiewicz, B.A., Bissett, D.L. and Buettner, G.R. Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin. *J. Invest. Dermatol.* 104: 484-488 (1995)
12. Thomas, J.P. and Girotti, A.W. Photogeneration of singlet oxygen by membrane bound hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* 47: 79S (1988)
13. Foote, C.S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 54: 659 (1991)
14. Darr, D. and Fridovich, I. Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* 102: 671-675 (1994)
15. Scharffetter-Kochanek, K. Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy. *Adv. Pharmacol.* 38: 639-655 (1997)
16. Kanofsky, J.R., Hoogland, H., Wever, R. and Weiss, S.J. Singlet oxygen production by human eosinophils. *J. Biol. Chem.* 263: 9692-9696 (1988)
17. Vile, G.F. and Tyrrell, R.M. UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Rad. Biol. Med.* 18: 721-730 (1995)
18. Tyrrell, R.M. and Pidoux, M. Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations. *Photochem. Photobiol.* 49: 407-412 (1989)
19. Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Briviba, K. and Sies, H. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* 331: 304-306 (1993)
20. Wlaschek, M., Briviba, K., Stricklin, G.P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.* 104: 194-198 (1995)
21. Oikarinen, A., Karvonen, J., Uitto, J. and Hannuksela, M. Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation. *Photodermatology* 2: 15-26 (1985)
22. Oikarinen, A. and Kallioinen, M. A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin. *Photodermatology* 6: 24-31 (1989)
23. Kligman, L.H. UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: A contrast to UVB effects. In: *Biological Responses to Ultraviolet A Radiation*. Urbach, F. (ed.). Valdemar, Overland Park, USA (1992)
24. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262: 5592-5595 (1987)
25. Barnes, S. Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *J. Nutr.* 125 (suppl): 777s-783s (1995)
26. Messina, M.J. Soyfoods: The role in disease prevention and treatment, pp. 442-477. In: *Soybeans, Chemistry, Technology, and Utilization*. Liu, K. (ed.). Chapman & Hall, London, UK (1997)
27. Ravanti, L., Heino, J., Lopez-Otin, C. and Kahari, V.-M. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 2446-2455 (1999)
28. Wang, Y., Yaping, E., Zhang, X., Lebwohl, M., DeLeo, V. and

- Wei, H. Inhibition of ultraviolet B (UVB)-induced *c-fos* and *c-jun* expression *in vivo* by a tyrosine kinase inhibitor genistein. *Carcinogenesis* 19: 649-654 (1998)
29. Schmid D. and Zulli, F. Topically applied soy isoflavones increase skin thickness. *Cosmet. Toil. Mag.* 117: 45-50 (2002)
30. Park, S.N., Choi, S.W., Boo, Y.C., Kim, C.K. and Lee, T.Y. Effects of flavonoids of ginseng leaves on Erythrocyte membranes against singlet oxygen caused Damage. *Korean J. Ginseng Sci.* 14: 191-199 (1990)
31. Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K. and Okubo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric. Biol. Chem.* 55: 2227-2233 (1991)
32. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. Damage to the bases in DNA Induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.* 264: 20509-20512 (1989)
33. Sharov, V.S., Kazamanov, V.A. and Vladimirov, Y.A. Selective sensitization of chemiluminescence resulted from lipid and oxygen radical reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 237-242 (1989)
34. Murphy, M.E. and Sies, H. Visible-range low-level chemiluminescence in biological systems, pp. 595-610. In: *Oxygen Radicals in Biological Systems, Oxygen Radicals and Antioxidants*. Packer, L. and Glazer, A.N. (eds.). Academic Press, New York, USA (1993)
35. Fujita, Y., Uehara, I., Morimoto, Y., Nakashima, M., Hatano, T. and Okuda, T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. *Yakugaku Zasshi* 108: 129-135 (1988).
36. Bissett, D.L., Chatterjee, R. and Hannon, D.P. Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem. Photobiol.* 54: 215-223 (1991)
37. Bissett D.L. and McBride, J.F. Iron content of human epidermis from sun-exposed and non-exposed body sites. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 43: 215-217 (1992)
38. Gutteridge, J.M.C., Rowley, D.A., Halliwell, B., Cooper, D.F. and Heeley, D.M. Copper and iron complexes catalytic for oxygen radical reactions in sweat from human athletes. *Clinica Chimica Acta.* 145: 267-273 (1985)
39. Fahrenholtz, S.R., Doleiden, F.H., Trozolo, A.M. and Lamola, A.A. On the quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochem. Photobiol.* 20: 505-509 (1974)
40. Girotti, A.W., Thomas, J.P. and Jordan, J.E. Prooxidant and anti-oxidant effects of ascorbate on photosensitized peroxidation of lipids in erythrocyte membranes. *Photochem. Photobiol.* 41: 267-276 (1985)
41. Graf, E. Application of phytic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 1861-1867 (1983)
42. Soriani, M. Hemadi, V. and Tyrrell, R.M. Modulation of *c-jun* and *c-fos* transcription by UVB and UVA radiations in human dermal fibroblasts and KB cells. *Photochem. Photobiol.* 71: 551-558 (2000)
43. Kick, G., Messer, G., Plewig, G., Kind, P. and Goetz, A.E. Strong and prolonged induction of *c-jun* and *c-fos* proto-oncogenes by photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* 74: 30-36 (1996)
44. Shao, Z.-M., Wu, J., Shen, Z.-Z. and Barsky, S.H. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 58: 4851-4857 (1998)
45. Kim, M.H., Albertsson, P., Xue, Y., Nannmakk, U., Kitson, R.P. and Goldfarb, R.H. Expression of neutrophil collagenase (MMP-8) in Jurkat T leukemia cells and its role in invasion. *Anticancer Res.* 21: 45-50 (2001)
46. Wei, H., Ca, Q., Rahn, R., Zhang, X., Wang, Y. and Lebwohl, M. DNA structural integrity and base composition affect ultraviolet light-induced oxidative DNA damage. *Biochemistry* 37: 6485-6490 (1998)
47. Liu, Z. Lu, Y. Lebwohl, M. and Wei, H. PUVA (8-methoxy-psoralen plus ultraviolet A) induces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA fragmentation in calf thymus DNA and human epidermoid carcinoma cells. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 127-133 (1999)
48. Trieu, V.N., Dong, Y., Zheng, Y. and Uckun, F.M. *In vivo* antioxidant activity of genistein in a murine model of singlet oxygen-induced cerebral stroke. *Radiat. Res.* 152: 508-516 (1999)
49. Orie, N.N., Zidek, W. and Tepel, M. Reactive oxygen species in essential hypertension and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Hypertens.* 12: 1169-1174 (1999)

(2003년 4월 14일 접수; 2003년 5월 17일 채택)