

## 산화적 스트레스로 유도된 V79-4 햄스터 폐 섬유아세포에 대한 천연물 분리 항산화물질 탐색

강경아 · 조수현<sup>1</sup> · 고영상<sup>2</sup> · 김진숙<sup>3</sup> · 현진원\*

제주대학교 의과대학 생화학교실, <sup>1</sup>생리학교실, <sup>2</sup>미생물학교실, <sup>3</sup>한국한의학연구원 한약제제연구부

## Screening of Anti-oxidants Isolated from Natural Products on V79-4 Hamster Lung Fibroblast Cells Induced by Oxidative Stress

Kyoung-Ah Kang, Su Hyun Jo<sup>1</sup>, Young Sang Koh<sup>2</sup>, Jin Sook Kim<sup>3</sup>, and Jin-Won Hyun\*

Department of Biochemistry, <sup>1</sup>Department of Physiology,

<sup>2</sup>Department of Microbiology, College of Medicine Cheju National University, Jeju-si 690-756, Korea,

<sup>3</sup>Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

**Abstract** – Reactive oxygen species (ROS) are known to cause oxidative modification of DNA, proteins, lipids and small cellular molecules and are associated with tissue damage and are the contributing factors for inflammation, aging, cancer, arteriosclerosis, hypertension and diabetes. We screened the anti-oxidants in V79-4 hamster lung fibroblast cells induced by hydrogen peroxide with eighteen pure compounds isolated from natural products. Allantoin, brassicasterol, and hypaconitine were found to strongly scavenge intracellular reactive oxygen species, which is measured by dichlorodihydrofluorescein diacetate method (DCHF-DA), and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical.

**Key words** – antioxidant, reactive oxygen species, allantoin, brassicasterol, and hypaconitine

호기성 호흡을 하는 생물체들은 끊임없이 산소 분자 (O<sub>2</sub>)를 세포 내로 받아들여 미토콘드리아 내의 산화환원 효소계 또는 외부 항원에 노출된 면역세포에 의해 그리고 외부적으로는 방사선 또는 여러 화합물 등에 의해 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 생성 한다. 이러한 활성 산소종으로는 O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superoxide anion), HO<sup>·</sup> (hydroxyl radical), <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (singlet oxygen), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide), HOCl (hypochlorous acid)를 들 수 있다. 하지만 생체에는 계속해서 생기는 이러한 활성 산소종을 제거하는 항산화효소계 (예를 들어 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase)와 여러 항산화 화합물 (vitamin C, vitamin E, uric acid, bilirubin) 등이 존재함으로써 활성 산소종의 생성과 제거사이에 균형을 갖추어 세포 기능을 유지하고 있다. 하지만 활성 산소종이 너무 많이 생성되거나 항산화시스템의 기능이 저하되는 상황에서 세포는 활성 산소종에 의해 유해 작용을 받는데 이를 “산화적 스트레스 (oxidative stress)”라고 한다. 그동안 많은 임상적

질환의 경우 산화적 스트레스가 증가되어 있으며 이들 질환에 항산화제를 투여시 완화된 결과가 계속 보고되었다. 예를 들어, 당뇨병 환자의 경우 산화적 스트레스가 정상인보다 증가되어 있으며 항산화제를 투여시 당뇨병 및 그 합병증이 경감되는 결과를 보였다.<sup>1)</sup> 현재 우리나라에서 과도한 스트레스와 음주 및 흡연, 각종 오염도의 증가 등 생활 패턴의 변화로 인하여 항산화물질의 요구량을 증가되고 있으나, 식생활의 서구화로 항산화 영양소의 섭취 수준이 점차 감소하고 있으므로 이에 따라 항산화 영양소의 섭취 및 보충의 필요성이 대두되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 항산화물질을 탐색하고자 분리된 천연 화합물들을 대상으로 실험을 실시하였다.

### 재료 및 방법

**재료** – Rhapontin, *cis*-aconitic acid, aconitine, emodin은 Sigma 회사에서, sennoside B, saikosaponin, evodiamine, brassicasterol, *trans*-aconitic acid, (+)-4-androstene-3,17-dione, allantoin, sennoside A, D(-)-amygdalin, closantel,

\*교신저자(E-mail) : jinwonh@cheju.ac.kr  
(FAX) : 064-726-4152

barbaloin, hyaconitine은 Wako 회사에서 그리고 chrysophanic acid, biochanin A는 Aldrich 회사로부터 구입하였다.

**세포 배양** - Chinese hamster lung fibroblast인 V79-4 세포 (ATCC CCL-93)를 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection, ATCC)에서 분양받아, DMEM (10% 우태아 혈청 첨가, 1% 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 이때 대수기 (log phase)에 성장하는 세포를 주로 실험에 사용하였다.

**시료 조제** - Dimethylsulfoxide (DMSO)용액에 용해시켜 사용하였다. 이때 세포에 처리 시 DMSO에 의한 영향을 배제하기 위해 최종 농도 0.1% 이내로 하였다. 화합물의 농도는 1 mg/ml 사용하였으며, positive 대조군으로 N-acetylcysteine (NAC) 50 mg/ml 사용하였다.

**DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거법** - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 항산화 효과를 볼 때 기본적으로 이용되는 물질로써 짙은 청색이 항산화 물질에 의해 환원됨에 따라 탈색되는 정도를 흡광도 측정하는 원리를 이용한 것이다.<sup>2)</sup> 화합물 1 mg/ml과  $1.5 \times 10^{-4}$  M의 DPPH 라디칼 용액을 혼합한 후 격렬하게 섞었다. 5 시간 동안 실온에서 반응시킨 후 남아 있는 DPPH 라디칼 양을 520 nm에서 측정된 후 다음 식에 의해 시료의 DPPH 라디칼 소거량 (DPPH radical scavenging activity %)을 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 저해율 (\%)} = \frac{\text{대조군 OD} - \text{시료 처리군 OD}}{\text{대조군 OD}} \times 100$$

**DCHF-DA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) 측정법** - 세포 내에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하기 위한 fluorometric 분석법으로서 비형광 물질인 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA)가 세포 내에 들어가 esterase 효소에 의해 dichlorodihydrofluorescein (DCHF)로 변환되고 다시 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응하여 dichlorodifluorescein (DCF)로 산화되면서 발색 되는 형광정도를 측정한다.<sup>3)</sup> V79-4 세포들을 well당 약  $3 \times 10^5$  세포 수가 되도록 96 well에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 하였다. 화합물 1 mg/ml을 세포에 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분간 배양하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (stock 20 mM)를 10 µl씩 가한 후 (최종 농도 1 mM) 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분간 배양하였다. DCHF-DA (stock 500 µM)를 20 µl씩 가한 후 spectrofluorometer (excitation 485 nm, emission 535 nm)로 측정하였다. 시료를 넣지 않고 활성 산소종 형성만을 측정할 것을 대조군으로 정하고, 시료를 넣어 활성 산소종을 소거 시키는 시료 처리군과 비교하여 활성 산소종 저해율을 구하였다. 모든 실험은 3번 반복하였다.

$$\text{활성 산소종 저해율 (\%)} = \frac{\text{대조군 OD} - \text{시료 처리군 OD}}{\text{대조군 OD}} \times 100$$

**통계 처리** - 실험 결과들은 ANOVA 분석법을 이용하여 유의성을 검정하였으며, p 값 < 0.05를 유의하다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

항산화 물질은 생체 내에서 생성되는 활성산소 및 활성산소에 의해 유도되는 지질 과산화 반응을 억제하며 고혈압, 협심증, 당뇨병과 같은 성인병을 예방해 주며 나아가 발암 및 노화를 억제하는 생리활성 물질로써 크게 각광을 받고 있다.<sup>4,5)</sup> 또한 최근 암 화학 예방 (chemoprevention)을 위한 물질의 항산화 효과에 대한 실험들이 방대하게 이루어지고 있다.<sup>6,7)</sup> 국외에서는 주로 정제된 단일 성분에 대한 연구가 많이 진행되는 반면에 국내에서는 에탄올 추출물이나 열수 추출물 등을 농축한 분획에서 항산화 활성을 많이 연구하고 있다. 현재 보고된 대표적 항산화 물질로는 ascorbic acid, tocopherol과 같은 비타민류,<sup>8)</sup> caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid와 같은 페놀산류, catechine과 같은 탄닌류, quercetin, kampferol과 같은 플라보노이드류,<sup>9,10)</sup> 카로티노이드류와 같은 물질들이다. 국내에서도 천연물에 대한 항산화 활성이 활발히 진행되고 있다. 예를 들어 약용으로 이용되고 있는 홍삼,<sup>11)</sup> 황금, 황기, 오미자,<sup>12)</sup> 치자,<sup>13)</sup> 더덕,<sup>14)</sup> 쑥쑥리,<sup>15)</sup> 어성초,<sup>16)</sup> 갈근, 음양곽,<sup>17)</sup> 시호<sup>18)</sup> 등에 의한 연구와 식용 채소류로 흔히 이용되는 냉이,<sup>19)</sup> 느타리 버섯,<sup>20)</sup> 양파즙,<sup>21)</sup> 들깨잎,<sup>22)</sup> 다시마나 미역, 김,<sup>23)</sup> 한국 고유의 산채류<sup>24)</sup> 등과 최근 음료수에 이용되는 솔잎과 쑥,<sup>25)</sup> 감잎,<sup>26)</sup> 녹차<sup>27)</sup> 등을 들 수 있다.

본 연구팀은 시중에서 판매되는 순수화합물 18종을 구입하여 항산화 물질을 탐색하고자 2가지 검색법을 이용하였다. 먼저 직접적으로 산소 라디칼을 제거할 수 있는 능력을 DPPH 라디칼 소거능력을 측정된 결과 cis-aconitic acid 11%, trans-aconitic acid 16%, allantoin 12%, (+)-4-androstene-3,17-dione 14%, brassicasterol 13%, hyaconitine 12%, rhapontin 21%, saikosaponin 13%을 나타냈으나 나머지 화합물들은 10% 미만으로 나타났다. 이는 positive control로 사용된 N-acetylcysteine (NAC)의 90%의 DPPH 라디칼 소거 작용과 비교하였을 때 이들 화합물이 직접적으로 산소 라디칼을 소거하는 효과는 거의 나타나지 않았다 (Table I). 하지만 이는 N-acetylcysteine (NAC)의 50 mg/ml에 비해 화합물의 경우 1 mg/ml을 사용하였으므로 사용 용량에 대한 영향을 배제할 수 없다. 그리고 세포의 항산화 시스템을 유도함으로써 산소 라디칼을 소거하는 능력을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 V79-4 세포에 처리하여 DCF-DA로 측정된 결과 positive control

**Table I.** Screening of compounds on DPPH scavenging activity

Compounds	DPPH scavenging activity (%)
N-aceylcystein	90*
cis-Aconitic acid	11
trans-Aconitic acid	16
Aconitine	6
Allantoin	12
D(-)-Amygdalin	6
(+)-4-Androstene-3,17-dione	14
Barbaloin	8
Biochanin A	8
Brassicasterol	13
Chrysophanic acid	8
Closantel	6
Emodin	4
Evodiamine	6
Hypaconitine	12
Rhapontin	21*
Saikosaponin	13
Senoside A	3
Senoside B	5

\*significantly different from control (p &lt; 0.05)

**Table II.** Screening of intracellular ROS scavenging activity on V79-4 hamster lung fibroblast cells induced by hydrogen peroxide

Compounds	Intracellular ROS scavenging activity (%)
N-aceylcystein	85*
cis-Aconitic acid	16
trans-Aconitic acid	34*
Aconitine	40*
Allantoin	42*
D(-)-Amygdalin	32*
(+)-4-Androstene-3,17-dione	31
Barbaloin	61*
Biochanin A	20
Brassicasterol	43*
Chrysophanic acid	23
Closantel	17
Emodin	12
Evodiamine	16
Hypaconitine	47*
Rhapontin	34*
Saikosaponin	29
Senoside A	27
Senoside B	22

\*significantly different from control (p &lt; 0.05)

로 사용된 N-acetylcystein (NAC)의 85%의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 라디칼 소거 작용과 비교하였을 때 aconitine 40%, allantoin 42%, barbaloin 61%, brassicasterol 43%, 그리고 hypaconitine 47%를 나타내었다 (Table II). 2가지 검색 시스템에서 비교적 효과를 나타낸 화합물은 allantoin, brassicasterol 그리고 hypaconitine이었다. Allantoin은 질소분자가 풍부한 화합물로서 동화작용, 대사작용, 수송 작용 및 질소저장 작용으로 식물에서 중요한 역할을 하는 화합물이다.<sup>28)</sup> *Polylthia longifolia*로부터 분리한 allantoin은 항 미생물 작용을 나타냈으며,<sup>29)</sup> *Macfadyena unguis*로부터 분리된 allantoin은 항 염증작용을 보임을 보고하였다.<sup>30)</sup> Brassicasterol은 식물에 존재하는 sterol의 일종으로 *Eryngium foetidum*과 *Teucrium polium*으로부터 분리한 brassicasterol은 항 염증작용을 나타낸다고 보고하였다.<sup>31,32)</sup> *Aconitum species*로부터 분리한 hypaconitine은 통각 억제 작용, 항 염증작용을 나타냄을 보고하였다.<sup>33,34)</sup> 일반적으로 염증반응은 면역세포에 의해 활성 산소종 (ROS)을 과다 생성함으로써 일어나는 반응의 하나이다. 그러므로 allantoin, brassicasterol, hypaconitine이 항 염증작용을 나타내는 것은 항 산화활성과 관계가 깊다고 할 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 과학 기술부 연구사업 (04년도 나노바이오 기술개발사업)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

## 인용문헌

- Ludvigsson, J. (1993) Intervention at diagnosis of type I diabetes using either antioxidants or photopheresis. *Diabetes Metab. Rev.* **9**: 329-336.
- Blosi, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
- Rosenkranz, A. R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K. M., Chen, W., Knapp, W., and Z labinger, G. J. (1992) A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. *J. Immunol. Meth.* **156**: 39-47.
- Fukuzawa, K. and Takaishi, Y. (1990) Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free Rad.* **1**: 55-61.
- Frei, B. (1994) Nonenzymatic antioxidant defense systems. In *Natural antioxidants in human health and disease*, Briviba, K. and Sies, H. (eds), Academic press, London, pp 107-120.
- Beecher, C. (1995) Potential chemopreventive compounds in the diet. In *chemoprevention of cancer*, Nixon, D. W. Ed., CRC press, Florida, pp. 21-62.
- Banerjee, S., Prashar, R., Kumar, A., and Rao, A. R. (1996) Modulatory influence of alcoholic extract of ocimum leaves on carcinogen-metabolizing enzyme activities and reduced

- glutathione levels in mouse. *Nutr. Cancer* **25**: 205-217.
8. Hudson, B. J. F. (1990) *Food antioxidants; Elsevier science.*, New York, pp. 102-135
  9. Cook, N. C. and Samman, S. (1996) Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.* **7**: 66-76
  10. Lee, Y., Haward, L. R., and Villalon, B. (1995) Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Food. Sci.* **3**: 473-476.
  11. 육홍선, 김성애, 조성기, 변명우(1996) 감마선 조사도니 홍삼분말의 항산화 효과 및 유전독성학적 안전성. *한국식품위생안전성학회지* **11**: 41-50.
  12. 김부여(1996) Chlorophyllin에 의한 수산화 라디칼의 제거. *한국과학기술원 석사 학위논문*
  13. 한용남, 오휘경, 황금희, 이미순(1994) 치자의 항산화 활성 성분에 관한 연구. *생약학회지* **25**: 226-232.
  14. 맹영선, 박해경(1991) 더덕 에탄올 추출물의 항산화 효과. *한국식품과학회지* **23**: 311-316.
  15. 오만진, 이기순, 손화영, 김성렬(1990) 칡뿌리의 항산화 성분. *한국식품과학회지* **22**: 793-798.
  16. 정차권, 함승시, 이상영(1999) 고지방 식이에 따른 어성초 추출물 투여가 혈청 지질 및 항산화 효소 활성에 미치는 영향. *한국식품과학회지* **28**: 205-211.
  17. 이종원, 도재호, 이성계(2000) 음양곽의 항산화활성. *한국식품과학회지* **29**: 732-736.
  18. 이은, 최무영(2000) 시호(Bupleuri Radix)분말이 과산화지질을 급여한 흰쥐의 혈장 및 간장지질구성도 항산화능에 미치는 영향. *한국영양학회지* **32**: 502-506.
  19. 광재혁, 권미향, 나경수, 성하진, 양한철(1996) 냉이로부터 superoxide anion radical 소거물질의 정제 및 이화학적 성질. *한국식품과학회지* **28**: 184-189.
  20. 정인창, 박신, 박경숙, 하효철, 김선희, 권용일, 이재성(1996) 느타리버섯 자실체 및 균사체 추출물의 항산화효과. *한국식품과학회지* **28**: 205-211.
  21. 박평심, 이병래, 이맹렬(1994) 양파즙이 에탄올에 의한 지질과산화물 생성에 미치는 영향. *한국영양식량학회지* **23**: 750-756.
  22. 이경임, 이숙희, 김정옥, 정혜영, 박진영(1993) 들깨잎 추출물의 항돌연변이 및 항산화 효과. *한국영양식량학회지* **22**: 175-180.
  23. 박재환, 강규찬, 백상봉, 이윤형, 이규순(1991) 식용 해조류에서 항산화 물질의 분리. *한국식품과학회지* **23**: 256-261.
  24. 박진아, 김미경(1999) 한국 고유의 산채류 첨가 식이가 흰 쥐의 지방대사 및 항산화능과 Cadmium 제독에 미치는 영향. *한국영양학회지* **32**: 353-368.
  25. 강윤한, 박용곤, 오상룡, 문광덕(1995) 솔잎과 쑥 추출물의 기능성 검토. *한국식품과학회지* **27**: 978-984.
  26. 박윤주, 강명희, 김종익, 박옥진, 이미숙, 장해동(1995) 감잎의 처리방법과 추출조건에 따른 감잎차의 vitamin C와 superoxide dismutase (SOD) 유사활성의 변화. *한국식품과학회지* **27**: 281-285.
  27. 김은성, 김미경(1999) 감잎, 녹차, 솔잎의 건분 및 에탄올 추출물의 흰쥐의 지방대사와 항산화능에 미치는 영향. *한국영양학회지* **32**: 337-352.
  28. Schubert K. R. and Boland, M. J. (1990) The ureides. In *The Biochemistry of Plants A Comprehensive Treatise*, Mifflin, B. J., Lea, P. J. (eds), Vol. 16: Intermediary Nitrogen Metabolism. Academic Press, San Diego, pp. 197-282.
  29. Faizi, S., Khan, R. A., Azher, S., Khan, S. A., Tauseef, S., and Ahmad, A. (2003) New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Planta Med.* **69**: 350-355.
  30. Duarte, D. S., Dolabela, M. F., Salas, C. E., Raslan, D. S., Oliveiras, A. B., Nenninger, A., Wiedemann, B., Wagner, H., Lombardi, J., and Lopes, M. T. (2000) Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). *J. Pharm. Pharmacol.* **52**: 347-352.
  31. Garcia, M. D., Saenz, M. T., Gomez, M. A., and Fernandez, M. A. (1999) Topical antiinflammatory activity of phytoosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytother. Res.* **13**: 78-80.
  32. Capasso, F., Cerri, R., Morrica, P., and Senatore, F. (1983) Chemical composition and anti-inflammatory activity of an alcoholic extract of *Teucrium polium* L. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **59**: 1639-1643.
  33. Murayama, M., Mori, T., Bando, H., and Amiya, T. (1991) Studies on the constituents of *Aconitum* species. IX. The pharmacological properties of pyro-type aconitine alkaloids, components of processed aconite powder 'kako-bushi-matsu': analgesic, antiinflammatory and acute toxic activities. *J. Ethnopharmacol.* **35**: 159-164.
  34. Gutser, U. T., Friese, J., Heubach, J. F., Matthiesen, T., Selve, N., Wilffert, B., and Gleitz, J. (1998) Mode of antinociceptive and toxic action of alkaloids of *Aconitum* spec. *Nauyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **357**: 39-48.

(2005년 1월 21일 접수)