

프로폴리스에서 분리한 플라보노이드 화합물의 항산화 활성 및 방사선 방어효과

정 일 윤

한국원자력연구소 방사선식품·생명공학연구팀

Antioxidant Activity and Radioprotection of Two Flavonoids from Propolis

Ill-Yun Jeong

Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejon 305-353, Korea

Abstract

Two flavonoids, 7-O-methyl-3',4'-didehydroxy quercetin (MDQ) and quercetin, isolated from Chinese propolis, which is the generic name for the resinous substance collected by honeybees from various plant sources, were tested for their antioxidant activity and protective effect against radiation-induced DNA damage in mouse lymphocytes. In antioxidant test, both compounds provided a dose-dependent scavenging effect on DPPH radical and a dose-dependent inhibitory effect on lipid peroxidation in mouse liver. Quercetin showed stronger scavenging and inhibitory effect than MDQ, and it also provided strong inhibition on superoxide anion radical generated in xanthine-xanthine oxidase system, but there was no inhibitory ability for MDQ. In comet assay using single cell gel electrophoresis, MDQ and quercetin showed a protective effect against DNA damage caused by gamma irradiation. They reduced DNA damage to 54% ($p<0.01$) and 53% ($p<0.01$) at 25 μmol , respectively. These results suggest that free radical scavenging seems to be associated with their catechol form on the B ring, and radioprotection appears to be a likely mechanism of antioxidant activity by these flavonoids.

Key words: propolis, flavonoids, antioxidant activity, radioprotection

서 론

산화적 스트레스는 유해산소(O_2^- , $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , ${}^1\text{O}_2$, ROO^-)들에 의해 세포나 세포 소기관의 막 지질 과산화에 의한 microsome 및 mitochondria 등의 소기관 손상, 효소 단백질의 아미노산 잔기의 산화를 통한 비가역적 불활성화, 핵산염기의 변형 및 산화적 분해 절단을 통한 손상과 DNA 손상을 유도하여 노화와 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 유해산소의 방어는 각종 질병의 치료 및 예방과 밀접한 관계를 가지고 있어서 최근에 더욱 많은 관심과 연구가 집중되고 있다(1-6).

최근 각광 받고 있는 프로폴리스는 BC 300년경부터 유럽이나 브라질 등에서 민간요법의 약제로서 널리 이용되어 기원전 1세기경에 Plinius의 저서 "Historia naturalis"에 신경통 격감, 부종억제, 농양 치료제 등으로 사용하여 왔으며 근래에 들어 항균, 항염증, 면역조절, 항궤양, 항고혈압, 항산화, 항암작용 등이 밝혀져 건강식품에 널리 활용되고 있다(7-15). 따라서 이러한 프로폴리스의 약리활성이 알려지면서 활성 유효성분에 관한 연구도 최근에 많이 진행되어 플라보노이-

드 화합물이 주성분이라는 것이 보고되고 있으며 대부분 가수분해되어 aglycon의 형태로 존재한다는 점이 큰 특징이다. Sud'ina와 Mirzoeva(16), Krol 등(17) 및 Nardini 등(18)은 프로폴리스 성분의 하나로서 caffeic acid의 lipoxygenase inhibitor 작용과 자유라디칼을 소거하는 항산화 효과 등을 보고하였고, Cizmarik과 Matel(19)은 galangine, chrysin, tectochrysin, isalpinin, pinocembrin을 분리하였으며 Vachalkova 등(20)은 프로폴리스로부터 quercetin 등 12종의 flavonoid 화합물을 분리하여 발암활성에 관하여 보고하였다.

위와 같이 프로폴리스의 다양한 효과와 천연물로서의 그 작용에 대한 연구가 진행되고 있으나, 항산화 활성 물질이 방사선에 의해 산화적 스트레스를 받은 DNA에 대하여 어느 정도의 방어효과가 있는지에 대해서는 광범위하게 연구가 되고 있지 않다.

이에 본 연구에서는 중국산 프로폴리스에서 7-O-methyl-3',4'-didehydroxy quercetin(MDQ)과 quercetin을 분리하여 항산화 활성(DPPH 라디칼 소거활성, 지질과산화 억제활성, superoxid anion 라디칼 소거활성)을 서로 비교검토한 후, comet assay를 이용한 단세포 전기영동(single cell gel

electrophoresis)을 실시하여 이들 화합물이 방사선 방어효과에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료제조

본 실험에 사용된 프로폴리스는 중국산으로 (주)서울프로폴리스에서 구입한 것을 사용하였고 시료의 제조는 프로폴리스 원액의 중량대비 10배의 80% ethanol을 가하여 약 40°C에서 8시간 동안 교반 추출하였다. 추출 후, 여과 및 농축을 거쳐 얻은 농축액을 -70°C에서 동결 건조시켜 시료로 사용하였다.

유효성분 분리 및 구조분석

유효성분의 분리를 위해 silica gel(230~400 mesh, Merck사)을 충진제로 하여 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 즉, 프로폴리스를 칼럼에 loading하여 hexane-ethyl acetate(4:1) 용매계로 용출한 후 재차 동일한 칼럼에서 aceton-MeOH(gradient), aceton-ethyl acetate(40:1) 및 hexane-ethyl acetate(7:1) 용매계로 재 정제하여 두 개의 순수 단일 물질(PP02, PP03)을 분리하였다. 분리한 두 화합물의 구조분석은 ¹H NMR 및 ¹³C NMR(Bruker AW-500 spectrophotometer)과 JEOLJMS-700 mass spectrometer를 이용하여 분석을 실시하였다.

DPPH 라디칼 소거 시험

DPPH 라디칼 소거활성 시험은 각 시료 0.2 mL에 4×10^{-4} M DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 용액(99.9% methanol에 용해) 1.8 mL씩을 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하여 30분 후 분광광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거활성은 DPPH의 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하였으며, 시료첨가와 비첨가구의 흡광도 감소 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{EDA}(\%) = (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

Rat liver microsome의 분리

Sprague-Dawley rat(180~220 g)의 간으로부터 차등 원심분리법으로 microsome을 분리하였으며, 모든 조작은 0~4°C의 저온에서 행하였다. Rat으로부터 간을 적출하여 세척한 후 냉각된 0.9% 생리 식염수에 넣고 2~3회 세척한 후 간 1 g당 9배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 조직분쇄하였다. 4°C, 9,000×g에서 20분간 원심분리한 후 다시 상등액을 4°C, 105,000×g에서 60분간 초원심 분리하여 microsome 분획을 얻었다. 이것을 50 mM Tris-buffer(pH 7.5)로 희석시키고 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 단백질 정량

을 하였다.

Rat liver microsome에서 지질과산화 억제시험

Fe²⁺/ascorbate 반응계에 의하여 최종 생성된 hydroxyl radical은 지질원인 microsome을 산화시켜 malondialdehyde(MDA)가 생성되는데, 이것을 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 분광학적 방법으로 정량하였다. 즉, Microsome(10 mg protein/mL) 50 μL, 50 mM Tris-buffer(pH 7.5) 750 μL, 시료 50 μL를 넣은 후 1 mM FeSO₄ · 7H₂O와 2 mM ascorbic acid 혼합액 200 μL를 넣고 30분간 반응시켰다. 반응용액에 20% TCA 용액 250 μL를 가하여 vortex한 후 1% TBA 용액 250 μL를 가하고 100°C에서 15분간 끓인 후 532 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = (\text{Ac}-\text{As})/(\text{Ac}-\text{Ab}) \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

Ab: 시료 및 1 mM FeSO₄ · 7H₂O/2 mM ascorbic acid 용액을 첨가하지 않은 blank의 흡광도

Superoxide anion 라디칼 소거 시험

Superoxide anion 라디칼 소거능 시험은 tetrazolium salt(WST-8 or CCK-8)활원법을 이용하여 측정하였다(21). 즉 superoxide anion 라디칼 생성은 96-well plate에 시료 5 μL, 10 mU/mL xanthine oxidase를 함유하는 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4) 50 μL, WST-8 용액 5 μL를 첨가하여 실온에서 1분간 안정화시킨 후 2.5 mM xanthine 40 μL를 가하여 30분 후에 시료에 의한 superoxide anion 라디칼 소거 효과를 spectrophotometer를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity}(\%) = (\text{Ac}-\text{As})/(\text{Ac}-\text{Ab}) \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

Ab: 시료 및 xanthine을 첨가하지 않은 blank의 흡광도

Lymphocyte의 분리 및 산화적 스트레스

Mouse의 말초혈액을 채취하여 Ficoll-Histopaque gradient 방법으로 림프구를 분리하고 HBSS에 수세한 후 10% fetal bovine serum, L-glutamine, antibiotics가 첨가된 RPMI 1640배지에 부유시켰다. 림프구 배양 시험판에 시료를 첨가하여 3시간 동안 배양한 다음, 산화적 스트레스를 부가하기 위해 Co-60 감마선을 1 Gy/min의 선량율로 2 Gy 조사하였다. 림프구는 방사선 조사 후 DNA 수복을 차단하기 위하여 전기영동을 시행하기 전까지 4°C를 유지하였다.

DNA의 산화적 스트레스에 대한 방어효과

Alkali 조건의 단세포 전기영동법(single cell gel electrophoresis: Comet assay)은 DNA 외가닥 절단과 alkali에 민감한 부위(Apurinic or Apyrimidinic site: AP site)를 민감하게 측정할 수 있기 때문에 유전독성물질을 감지하기 위한

생물학적 표지자로 각광을 받고 있다. 실험은 Singh 등(22)의 방법에 따라 방사선에 의한 혈액 림프구(세포)의 DNA 손상 정도를 측정하기 위하여 세포를 agarose와 혼합하고 이를 slide에 점적한 후 lysis buffer에서 4°C로 1시간 동안 용해시켰다. 용해시킨 slide는 electrophoretic buffer를 이용 25 V, 300 mA에서 25분간 전기영동을 시행하였다. 60 μL의 ethidium bromide(20 μL)로 염색한 후 CCD 카메라가 부착된 형광 현미경을 사용하여 이미지 분석 프로그램(Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)을 통해 60개의 세포를 선택하여 분석하였다. DNA 손상정도는 tail 길이와 tail내 DNA 파편(fragment)을 수치화시킨 tail moment(TM)로 나타내었으며 TM 값이 증가할수록 DNA가 손상을 많이 받은 것을 의미한다.

$$TM \text{ (tail moment)} = (\text{tail mean} - \text{head mean}) \times \text{tail \%DNA}/100$$

결과 및 고찰

유효성분의 구조분석

분리한 두 화합물에 대한 구조분석은 분광학적 기기 및 참고문헌의 data와 비교하여 동정하였다. PP02의 ^1H NMR 분석에서 C ring의 3H 분에 해당하는 methoxy group의 단일 peak가 3.9 ppm에서 나타났으며 6.4와 6.8 ppm에서 C ring의 2H 분에 해당하는 doublet peak가 관찰되었다. B ring에 해당되는 5H 분의 proton은 7.5와 8.2 ppm에서 multiple 및 doublet peak의 형태로 각각 나타났다. ^{13}C NMR에서는 C ring의 대칭면 존재로 총 14개의 carbon 수가 관찰되었고

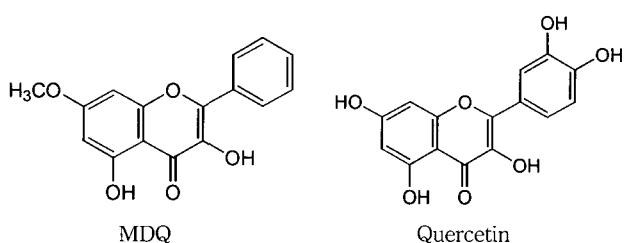


Fig. 1. Chemical structures of 7-*O*-methyl-3',4'-dihydroxy quercetin (MDQ) and quercetin from propolis.

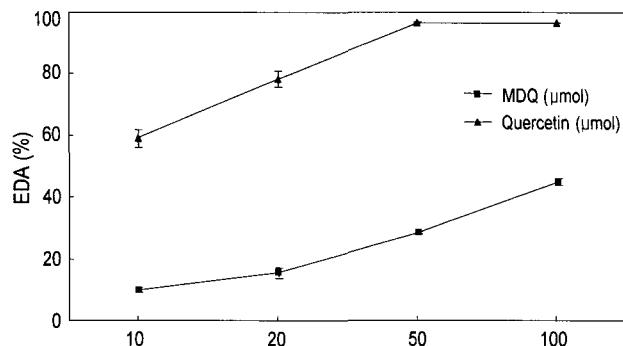


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of MDQ and quer-
cetin.

EDA (electron donating ability) = [(1 - absorbance of sample treatment at 517 nm/absorbance of control treatment at 517 nm) × 100]. Data were presented as means ± SD (n=3).

127.7과 128.4 ppm에서 2C 분으로 각각 적분되었다. 본 결과를 바탕으로 PP02는 7-*O*-methyl-3',4'-didehydroxy quer-cetin(MDQ)으로 동정되었으며 PP03에 대한 구조분석에서의 ¹H 및 ¹³C NMR data는 문현치(23)의 분석결과와 비교하였을 때 전형적인 quercetin과 일치하였다(Fig. 1, Table 1).

DPPH 라디칼 소거활성

안정한 자유 라디칼인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성에 미치는 MDQ 및 quercetin의 활성을 비교하여 Fig. 2에 제시하였다. 두 화합물은 10, 20, 50, 100 μmol에서 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거효과를 나타내었다. MDQ는 최대 농도인 100 μmol에서 40% 이상의 소거활성을 보였고 quercetin은 동일농도에서 90% 이상의 강한 라디칼 소거활성을 보였다.

자질과사화 억제확성

MDQ 및 quercetin이 rat의 간으로부터 적출한 microsome에 대한 지질과산화물 형성 억제활성에 미치는 결과를 비교하여 Fig. 3에 제시하였다. 두 화합물은 DPPH 라디칼 소거활성 농도보다 낮은 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μmol 의 농도에서 농도 의존적인 지질과산화 억제효과를 보였으며 MDQ는 4.0 μmol 에서 약 50%의 억제활성을 quercetin은 0.5 μmol 에서 70% 이상의 높은 지질과산화물 형성 억제효과를 나타내었다.

Table 1. Spectroscopic and mass data of MDQ and quercetin

	7-O-methyl-3',4'-didehydroxy quercetin (MDQ)	Quercetin
¹ H NMR (DMSO, 500 MHz) ^d	3.9 (s, 3H, OCH ₃), 6.4 (d, <i>J</i> =1.5 Hz, 1H) 6.8 (d, <i>J</i> =1.0 Hz, 1H), 7.5 (m, 3H), 8.2 (d, 2H)	6.2 (d, <i>J</i> =3.5 Hz, 1H), 6.4 (d, <i>J</i> =3.0 Hz, 1H) 6.9 (d, <i>J</i> =14.0 Hz, 1H), 7.5 (dd, <i>J</i> =3.5 14.0 Hz, 1H) 7.7 (d, <i>J</i> =4.0 Hz, 1H)
¹³ C NMR (DMSO, 125 MHz) ^d	55.8, 91.8, 97.7, 104.4, 127.7(2C), 128.4(2C), 129.9, 131.0, 137.4, 145.8, 156.8, 160.9, 165.5, 176.2	94.2, 99.0, 103.9, 115.9, 116.4, 120.8, 122.8, 136.6, 145.9, 147.7, 148.6, 157.0, 161.6, 164.7, 176.7
MS (<i>m/z</i>)	285 (M+H) ⁺	303 (M+H) ⁺

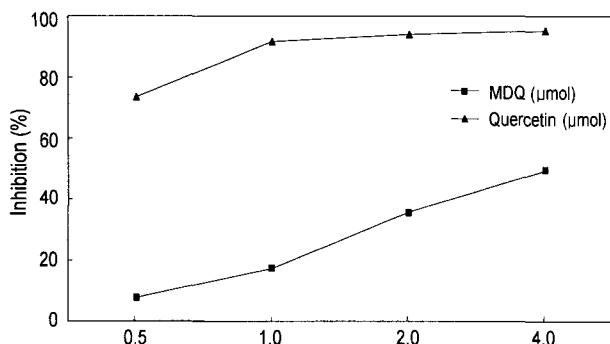


Fig. 3. Lipid peroxidation inhibitory activity of MDQ and quercetin.

Inhibition (%)=[(1-absorbance of sample treatment at 532 nm/absorbance of control treatment at 532 nm)×100]. Data were presented as means±SD (n=3).

Superoxide anion 라디칼 소거활성

Xanthine과 xanthine oxidase와의 반응에 의해 생성되는 superoxide anion radical 소거활성에 미치는 MDQ 및 quercetin의 활성을 비교하여 Fig. 4에 제시하였다. MDQ는 2, 8, 30, 60 μmol의 농도에서 소거활성이 관찰되지 않았고 동일

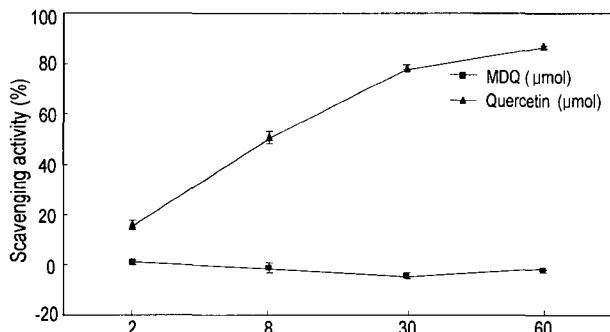


Fig. 4. Scavenging activity of MDQ and quercetin on superoxide anion radical generated in xanthine-xanthine oxidase system.

Scavenging activity (%)=[(1-absorbance of sample treatment at 560 nm/absorbance of sample and xanthine no treatment at 560 nm)×100]. Data were presented as means±SD (n=3).

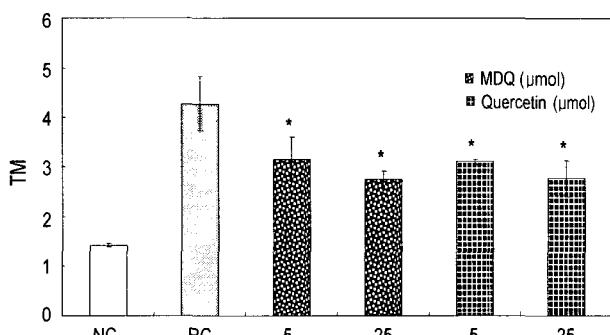


Fig. 5. Protective effect of MDQ and quercetin on radiation-induced DNA damage in mouse lymphocyte.

NC: normal control, RC: radiation control.

TM (tail moment)=(tail mean - head mean)×tail %DNA/100.
*p<0.01 compared to radiation control.

농도에서 quercetin은 높은 소거활성을 보였다. 특히 quercetin은 8 μmol의 농도에서 50% 이상의 소거활성을 나타냈다.

DNA에 대한 방사선 방어효과

Mouse 림프구에서 방사선에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 MDQ 및 quercetin의 방어효과를 비교하여 Fig. 5에 제시하였다. MDQ는 5 및 25 μmol의 농도에서 39% 및 54%(p<0.01)를 quercetin은 동일 농도에서 41% 및 53%(p<0.01)의 방사선 방어효과를 보였으며 두 화합물의 농도 증가에 따른 방어효과의 증감은 통계학적으로 유의성(p>0.05)이 관찰되지 않았다.

요약

프로폴리스에서 분리한 MDQ 및 quercetin의 작용기에 따른 항산화 효과를 비교 분석하고 방사선 조사에 의한 DNA의 산화적 손상에 있어서 두 화합물이 어느 정도의 방어효과가 있는지를 측정하고자 하였다. 두 화합물의 항산화 활성 시험(DPPH 라디칼 소거활성, 지질과산화 억제활성, superoxide anion 라디칼 소거활성)에서 quercetin이 MDQ 보다 훨씬 강한 항산화 활성을 보였으며, 특히 superoxide anion 라디칼 소거활성 시험에서 MDQ는 거의 활성을 보이지 않았지만 quercetin은 농도 의존적인 강한 소거활성을 보였다. 또한, mouse 림프구에서 방사선 조사에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 두 화합물의 방어효과 시험에서 MDQ 와 quercetin은 동일 농도에서 거의 유사한 방사선 방어효과가 관찰되었다. 상기의 결과로부터 두 화합물의 작용기를 고려해 볼 때 B ring에 있는 catechol 작용기의 존재 유무에 따라서 항산화 활성의 차이가 있으며 또한 MDQ 화합물의 C ring에 존재하는 methoxy group은 quercetin에 존재하는 hydroxy group과 비교해 볼 때 항산화를 비활성화시키는 작용기의 하나로서 판단되어진다. 따라서 본 실험의 결과로 미루어 볼 때 방사선 방어효과는 항산화 활성에 미치는 메카니즘과 유사하게 작용하는 것으로 판단되어지며 아울러 일차적으로 항산화 활성 물질을 겸색함으로써 산화적 스트레스에 의한 DNA에 대한 방어물질 겸색 수단으로서 유용할 것으로 사료된다. 이상의 결과로부터 프로폴리스는 산화적 스트레스에 대한 경감제로서 그 가능성성이 시사되었다.

감사의 글

본 논문은 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행된 연구의 결과이며, 그 지원에 감사드립니다.

문헌

- Fridovich I. 1974. Superoxide radical and the bacterial action of phagocytotes. *J Med* 290: 624-625.

2. McCord JM. 1974. Free radical and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529-531.
3. Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
4. Lynch RE, Fridovich I. 1978. Effect of superoxide on erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 253: 1838-1845.
5. Freeman BA, Grapo JD. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
6. Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11.
7. Wanscher B. 1976. Contact dermatitis from propolis. *J Dermatol* 94: 451-455.
8. Havsteen B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology* 32: 1141-1148.
9. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. 1991. Antibacterial, antifungal, anti-amoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 35: 77-82.
10. Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zaduanisky JA, Huang M, Ferraro T, Conney AH, Grunberger D. 1993. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res* 53: 1255-1261.
11. Pascual C, Gonzalez R, Toricella RG. 1994. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 41: 9-13.
12. Tatefuji T, Izumi N, Ohta T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. 1996. Isolation and identification of compounds from Brazilian which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol Pharm Bull* 19: 966-970.
13. Lin S, Lin Y, Chen C, Chung C, Hsu S. 1977. The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chromic alcohol-induced liver injuries. *Am J Chin Med* 25: 325-332.
14. Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M, Satoh T. 1997. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* 20: 496-501.
15. Munstedt K. 2001. Propolis, current and future medical uses. *American Bee J* 141: 506-507.
16. Sud'ina GF, Mirzoeva OK. 1993. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS* 329: 2-24.
17. Krol W, Scheller S, Czuba Z, Matsuno T, Zydowicz G. 1996. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extracts of propolis and its phenolic components. *J Ethnopharmacol* 55: 19-25.
18. Nardini M, Natella F, Gentili V, Maurizio C, Felice D. 1977. Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat. *Arch Biochem Biophys* 342: 157-160.
19. Cizmarik J, Matel I. 1978. Study of the chemical structure of propolis. Isolation and identificatio of 4-oxy-3-methoxycinnamic acid from propolis. In *Propolis*. Apimondia Publishing House, Bucharest, Romania. p 30.
20. Vachalkova A, Novotny L, Solivajsova A, Suchy V. 1995. Polarographic behavior of flavonoids from propolis and their potential carcinogenity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 36: 137-143.
21. Chung HY, Kim HB. 2000. *In vitro* studies in the superoxide scavenging activities, the cytotoxic and the immunomodulating effects of thirteen kinds of herbal extracts. *Korean J Food Sci Technol* 32: 699-705.
22. Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. 1995. Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of γ -ray. *J Radiat Biol* 66: 563-569.
23. Fossen T, Pedersen A, Andersen ØM. 1997. Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 47: 281-285.

(2004년 12월 3일 접수; 2005년 1월 27일 채택)