

식품소재 라이브러리를 이용한 천식 완화용 물질의 초고속스크리닝 기법 개발

허진철 · 박자영 · 권택규¹ · 정신교 · 김성욱² · 이상한[†]

경북대학교 식품공학과, ¹계명대학교 면역학교실, ²한국생명공학연구원 세포기능조절연구실

Development of High Throughput Screening Techniques Using Food-borne Library against Anti-asthma Agents

Jin-Chul Heo, Ja-Young Park, Taeg Kyu Kwon¹ Shin Kyo Chung, Sung-Uk Kim² and
Sang-Han Lee[†]

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹Department of Immunology, Keimyung University School of Medicine, Daegu 700-712, Korea

²Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-333, Korea

Abstract

Oxidant stress is a well-known pivotal parameter for the degenerative immune diseases including asthma, atopic dermatitis, and rhinitis. In order to screen for anti-asthma agents effectively, we first established the infrastructure of high throughput screening (HTS) for anti-oxidant agents from agricultural products and/or oriental medicine library extracted with water, methanol, dimethyl sulfoxide, ethyl acetate and juice. Using the screening system, we found that *Chaenomelis langenariae*, *Rhus javanica* L., *Camellia sinensis*, *Helianthus annuus* and *Angelica utilis* Makino had strong anti-oxidant activity. Moreover, *Helianthus annuus*, *Rehmannia glutinosa* Libo and *Angelica utilis* Makino have protection activities by treatment of an oxidant hydrogen peroxide. Together, these results suggest that screened agents could be potential agents against asthma, although the *in vivo* studies should be clearly tested.

Key words : High throughput screening, anti-asthma agents, library, establishment

서 론

최근의 새로운 식품의약의 개발은 크게 두 가지의 관점에서 주목할 수 있는데 이는 시간과 비용의 측면이다. 이들 두 가지의 측면을 만족시킬 수 있는 것이 자동화(automation)인데, HTS(high throughput screening) system은 시간의 단축과 비용의 절감이라는 두 가지 측면을 만족시켜주는 유용한 방법으로 알려져 있다(1-2).

HTS system의 최대 장점은 단위시간에 동일한 방법의 실험을 많은 후보물질을 이용하여 할 수 있다. 많은 수를 가진 96/384/1536 등의 microplate를 사용함으로써 보다 적은 공간에서 많은 양의 실험이 가능하며, 또한 micropipettor

의 사용으로 적은 양의 reagent를 사용 할 수 있는 장점이 있다(3). 이러한 과정을 자동화함으로써 이전의 고전적이며 수동적인 작업에 의한 시간의 절약을 가져올 수 있으며, 장비와 기구에 의해 실험의 정밀도를 높임으로서 그 비용을 크게 줄일 수 있는 이점이 있다(4).

과민성 염증반응의 대표적인 질환으로서 천식(asthma)을 들 수 있다. 이는 아토피성 피부염, 발진, 기관지 천식, 알러지성 비염 등과 함께 중요한 allergy 질환으로 알려져 있다. 최근 천식의 발병율은 급증하는 현상을 보이고 있는데, 이는 공업화에 따른 대기오염의 영향 등이 큰 것으로 알려져 있다(5-6). 면역적인 과민 반응의 제반 증상(재채기, 콧물, 감기증세, 그리고 가려움증)외에 심지어 정맥동염(sinusitis)이나 천식과 같은 심각한 호흡기 만성질환으로 연결되어 생명에 지장을 초래 할 수 있는 것으로 알려져 있다(7). 산화스트레스(oxidant stress)는 대표적으로 superoxide

[†]Corresponding author E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

anion (O₂)와 hydro radical (OH) 등이 있는데 이들 물질은 공유전자쌍을 가지지 않기 때문에 매우 불안정한 분자들이다. 생물학적으로 산화스트레스에 노출이 되면 전자전달계 (mitochondria의 전자전달계, phagocyte의 활성화)에 이상을 유발할 수 있는데, 이는 외부적인 요인(꽃가루, 담배연기 등)에 의한 경우가 많다. 생물체 내에서는 허파나 산소의 2차대사에 영향을 주게 되며, 최종적으로 이는 단백질, DNA, 지방 등의 대사에 영향을 준다(8).

산화스트레스는 천식과 밀접한 관련성을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 그 대표적인 것이 산화스트레스에 의한 염증반응이다. 염증반응은 천식의 초기에 나타나는 대표적인 증상이다(9-10). 호흡기 질환 환자에 있어 oxidant와 anti-oxidant의 비율이 정상인에 비해 불균형하게 나타나는 것으로 보고된 바 있는데, 치료의 면에서 superoxide의 저해물질인 superoxide dismutase (SOD)가 호흡기 질환을 완화시켜주는 것으로 알려져 있으며, 치료의 목적으로 anti-oxidant가 이용될 수 있다는 보고도 있다(11-12). Reactive oxygen species (ROS)는 면역계통에서도 이상을 유발하는 것으로 알려져 있어 이를 억제하는 물질을 식품에 첨가하려는 보고도 많이 있다(13-15). 그러나 천식에 대한 치료 방법으로는 많은 경우 대증요법에 의존하여, 기관지 천식이 발생하였을 경우에는 기관지 확장제를 사용하거나 항히스타민제를 사용하여도 일시적으로 증세를 완화시켜주는 작용만이 있을 뿐이며, 근원적인 치료방법이 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 천식과 관련한 치료제를 개발하기 위한 일련의 과정 중 기능성 천식 완화 식품소재를 농산물(농산식품, 원예식물, 한약식물류 등)로부터 개발하고자 먼저 항산화제에 관련된 HTS system을 구축하고 이를 이용하여 식품소재 라이브러리로부터 활성이 인정되는 몇 가지의 추출물을 얻을 수 있었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 재료로서 한약재의 경우 서울 경동시장의 한약상회에서 공급받아 실험에 사용하였으며, 농산물과 일부 한약재의 경우는 한국생명공학연구원 내의 자생식물이용개발사업단 한국식물추출은행에서 구입 후 사용하였다.

실험에 사용된 시약으로는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; St. Louis, MO), ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ; Sigma No. St. Louis, MO), linoleic acid (Sigma No. St. Louis, MO), 2-deoxy-D-ribose (Sigma No. St. Louis, MO), CCK-8 kit (water-soluble tetrazolium salt; 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt; DOJINDO, Kumamoto,

Japan) 등이 사용되었다.

식품소재용 라이브러리의 조제

서울 경동시장으로부터 구입한 한약재 200여종과 한국식물추출은행으로부터 구입한 50여종의 재료를 각각 용매별로 다르게 추출을 하여 약 1,000여개의 library를 제작하였다. 한약재와 건과류는 증류수, DMSO, ethyl alcohol, methyl alcohol, ethyl acetate를 이용하여 24시간동안 추출과정(0.1-0.5 g/mL)을 거쳤으며, 증류수 추출물은 섭씨 60°C에서 열수 추출을 하였다. 채소류의 경우는 막자사발을 이용하여 파쇄 후 그 추출액을 이용하였다. 이후 HTS가 적용 가능한 well plate로 옮긴 다음 -20°C에 보관 후 실험에 사용하였다 (Table 1).

Table 1. A list of natural products for anti-asthma agent screening

No	Scientific name	Korean name	Extract condition					
			Solvent					
			DW ¹⁾	DM	EM	ME	EA	Ju
1	<i>Acanthopanax senticosus</i>	오가피						
2	<i>Achyranthes japonica</i>	우슬						
3	<i>Aconiti Kusnezoffii Radix</i>	초오						
4	<i>Aconiti Tuber</i>	천오						
5	<i>Aconitum carmichaeli Debeaux</i>	부자(당포)						
6	<i>Acori graminei Rhizoma</i>	석창포						
7	<i>Aecelomyces tenuipes</i>	누에						
8	<i>Agrimonia pilosa Ledeb</i>	선학초						
9	<i>Akebiae caulis</i>	목동						
10	<i>Aletris canaliculatum</i>	택사						
11	<i>Allii tuberosi Semen</i>	구자						
12	<i>Aloe barbadensis Miller</i>	노회						
13	<i>Alpiniae officinarum Rhizoma</i>	양강						
14	<i>Ammomi tsao-ko Fructus</i>	초과						
15	<i>Anomali cardamomi Fructus</i>	백두구						
16	<i>Amomum xanthoides Wallich</i>	사인						
17	<i>Amygdalae carapax</i>	별갑						
18	<i>Anemarrhena asphodeloides Bunge</i>	지모						
19	<i>Angelica gigas Nakai</i>	잎당귀						
20	<i>Angelica utilis Makino</i>	산선초						
21	<i>Angelicae dahuricae Radix</i>	백지						
22	<i>Anthriscus aemula Schisch</i>	전호						
23	<i>Aphis gossypii Grover</i>	건포도						
24	<i>Apium graveolens</i>	셀러리						
25	<i>Arachis hypogaea L.</i>	땅콩						
26	<i>Araliae cordatae</i>	독활						
27	<i>Arecae pericarpium</i>	빈랑						
28	<i>Arisaematis rhizoma</i>	남성						
29	<i>Aristolochiae fructus</i>	마두령						
30	<i>Armeniaca semen</i>	행인						
31	<i>Artemisia capillaris Thunb</i>	인진						
32	<i>Asarum sieboldii Miquel var</i>	세신						
33	<i>Asnu gelatinum</i>	아교						
34	<i>Asparagus cochinchinensis Merr</i>	천문동						

¹⁾Abbreviation Dw, distilled water, DMSO, dimethyl sulfoxide, EM, ethanol, ME, methanol, EA, ethyl acetate and Ju, juice

35	<i>Aspergillus oryzae</i> Cohn	신곡	93	<i>Commiphora molmol</i> Engl	몰약
36	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	황기	94	<i>Coptis chinensis</i> Franch.	황련
37	<i>Atractylodes japonica</i> Kitag	백출	95	<i>Cordyceps militaris</i>	동충하초
38	<i>Aurantii fructus</i>	지각	96	<i>Coriolus versicolor</i>	운지
39	<i>Aurantii nobilis</i> Pericarpium	진피	97	<i>Cornus officinalis</i>	산수유
40	<i>Bambusae caulis</i> Taeniam	죽여	98	<i>Corydalis turtschanovii</i> Bess	현호
41	<i>Bambusae folium</i>	죽엽	99	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	산사
42	<i>Beta vulgaris</i> L.	적근대	100	<i>Croton tiglium</i> Linne	파두
43	<i>Botae orientalis</i> Folium	축백	101	<i>Cucumis sativus</i> Linn.	오이
44	<i>Bombycis excrementum</i>	잠사	102	<i>Cucurbita moschata</i>	호박씨
45	<i>Bombyx cum</i> Batryte	백강잠	103	<i>Curcuma aromata</i> Salisbury	강황
46	<i>Brassica lee</i> ssp	쌈추	104	<i>Curcuma zedoaria</i>	봉출
47	<i>Brassica alba</i>	배추겨자	105	<i>Cuscuta japonica</i> Choisy	토사자
48	<i>Brassica campestris</i> var	청경채	106	<i>Cymbidium goeringii</i> Reicfb	유향
49	<i>Brassica campestris</i> var. <i>narinosa</i>	비타민(플)	107	<i>Cynanchum ascyryfolium</i> Matsumura	백미
50	<i>Brassica juncea</i>	적겨자	108	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsl	하수오
51	<i>Brassica nigra</i>	청겨자	109	<i>Cynomori Herba</i>	쇄양
52	<i>Brassica oleracea</i> L.	케일	110	<i>Cyperus rotundus</i> L.	향부자
53	<i>Brassica oleracea</i> var	뉴그린	111	<i>Dendrobium moniliforme</i> Swartz	석곡
54	<i>Brunella vulgaris</i> L.	하고초	112	<i>Denophora triphylla</i>	사삼
55	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	시호	113	<i>Dianthus chinensis</i> L.	구맥
56	<i>Caesalpiniae lignum</i>	소목	114	<i>Dictamnus dyscarpus</i> Turcz	백선
57	<i>Camellia sinensis</i>	녹차엽	115	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne	신약
58	<i>Capsicum annuum</i> L.	고추	116	<i>Dioscorea tokoro</i> Makino	비해
59	<i>Capsicum annuum</i> var <i>grossum</i>	피망	117	<i>Dolichos lablab</i> L.	백편두
60	<i>Caragana sinica</i> Rehder	골담초	118	<i>Drynaria fortunei</i> (Kze.) J sm.	골쇄포
61	<i>Cardamome flexuosa</i> Withering	정력자	119	<i>Elfungia applanata</i> Karst	상황지
62	<i>Carthami flos</i>	홍화	120	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	마황
63	<i>Caryophylli flos</i>	정향	121	<i>Epimedii koreanum</i> Nakai	음양곽
64	<i>Cassia occidentalis</i> L.	석결명	122	<i>Eryobotrya japonica</i> Lindl	비파엽
65	<i>Cassia obtusifolia</i> L.	결명자	123	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver	두중
66	<i>Castaneae semen</i>	견을	124	<i>Euphoria longana</i>	용안육
67	<i>Casthamus tincorius</i>	홍화씨	125	<i>Evodia raiacarpa</i> Hooker fil	오수유
68	<i>Cervi cornu</i> Pantotrichum	녹용	126	<i>Forsythia koreana</i> Nakai	연교
69	<i>Chaenomeles langeneriae</i>	해당근	127	<i>Fritillariae bulbis</i>	패모
70	<i>Chichorium intybus</i> L.	칙콘	128	<i>Galli stomachicum</i> Conum	계내금
71	<i>Chrysanthemi flos</i>	감국	129	<i>Ganoderma lucidum</i>	영지
72	<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	쑥갓	130	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	치자
73	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> Herbich	구절초	131	<i>Gentiana scabra</i> Bunge var	용담초
74	<i>Ciboti rhizoma</i>	구척	132	<i>Geoclemys reevesii</i> Gray	귀판
75	<i>Cicadae periostracum</i>	선퇴	133	<i>Gastrodia elata</i> Blume	천마
76	<i>Cichorium intybus</i> L.	적치	134	<i>Ginkgo bioba</i>	은행
77	<i>Cichorium endivia</i>	치커리(뿌리)	135	<i>Gleditschia horrida</i> Makino	조각자
78	<i>Cichorium endivia</i> L.	벨지움(잎)	136	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	감초
79	<i>Cichorium intybus</i>	레드치커리	137	<i>Gossypium indicum</i>	면화자
80	<i>Cimicifugae rhizoma</i>	승마	138	<i>Gryfolia umbellata</i>	저령
81	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	계지	139	<i>Halloysitum rubrum</i>	적석지
82	<i>Cinnamomum loureiri</i> Nees	계피	140	<i>Hedyotis diffusa</i>	백화사절초
83	<i>Cirsium maackii</i>	대계근	141	<i>Helianthus annuus</i>	해바라기씨
84	<i>Cistanche salsa</i> Benth et Hook	육종용	142	<i>Hocquartia manshuriensis</i>	통초
85	<i>Citrus unshui</i> Markovich	귤피	143	<i>Hoelen cum Pmi</i>	복신
86	<i>Citrus unshui</i> Markovich	귤핵	144	<i>Hoelen rubra</i>	적복령
87	<i>Clematis mandshurica</i> Maxim	위령선	145	<i>Hordium sativum</i> Jess.var	맥아
88	<i>Cnidium monnieri</i>	사상자	146	<i>Houttuynia cordata</i> Thumb	어성초
89	<i>Cocculus orbiculatus</i>	방기	147	<i>Hovenia dulcis</i> Thumb	지구자(헛개)
90	<i>Codonopsis lanceolata</i>	터덕(=양유)	148	<i>Inula britannica</i> var	선복화
91	<i>Codonopsis pilosula</i>	만삼	149	<i>Inula helenium</i> L.	목향
92	<i>Coxi lachryma-jobi</i> var	울무	150	<i>Juglans sinensis</i>	호두

151	<i>Juncus effusus</i> var	등심초	209	<i>Polygonum aviculare</i> L.	편축
152	<i>Kalopanax pictum</i> Nakai	해동피	210	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb	적하수오
153	<i>Lactuca sativa</i>	청오클립	211	<i>Polypori umbellati</i> Polyporaceae	복령피
154	<i>Lactuca sativa</i> L.	롤라로사	212	<i>Poncirus trifoliata</i> Rafin	지실
155	<i>Lactuca sativa</i> Linn	상추	213	<i>Poria cocos</i> Wolf	백복령
156	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	익모초	214	<i>Prunus nakai</i> Lev	옥리인
157	<i>Ligustici rhizoma</i>	천궁	215	<i>Psoralea corvifolia</i> L.	파고지
158	<i>Ligustrum obtusifolium</i>	여정실	216	<i>Pueraria thunbergiana</i>	갈근
159	<i>Lilium speciosum</i> Thunb	백합	217	<i>Puerariae flos</i>	갈화
160	<i>Lindera strychnifolia</i> F Villars	오약	218	<i>Quisqualis indica</i> L.	사군자
161	<i>Linum usitatissimum</i> L.	아마자(아마인)	219	<i>Raphanus sativus</i> Linne	내복자
162	<i>Luhospermum erythrorhizon</i> Sieb	자초	220	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libo	시금치
163	<i>Lonicera japonica</i> Thunb	인동초(잎)	221	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz	숙지황
164	<i>Lonicera japonica</i> Thunb	금은화(꽃)	222	<i>Reynoutria japonica</i> Houtt	호장근
165	<i>Lycium chinense</i> Miller	구기자	223	<i>Rheum coreanum</i> Nakai	대황
166	<i>Lycocionium pseudo-leave</i> Nakai var	진교	224	<i>Rhus javanica</i> L.	오배자
167	<i>Lycopus lucidus</i> Turcz	향유	225	<i>Rosae laevigatae</i>	금앵자
168	<i>Lycoris squamigera</i> Maxim	선모	226	<i>Rubia cordifolia</i> L. var	천초
169	<i>Lygodium japonicum</i>	해금사	227	<i>Rubus coreanus</i>	복분자
170	<i>Magnolia obovata</i> Thunb	후박	228	<i>Sabina chinensis</i> Antoine	지단향
171	<i>Magnoliae Flos</i>	신이화	229	<i>Salvia miltorrhiza</i> Bunge	단삼
172	<i>Malva verticillata</i> L.	아욱	230	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	지유
173	<i>Matris sulfas</i>	망초	231	<i>Santalum album</i> L.	백단향
174	<i>Melia azedarach</i> L.	고련피	232	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schusck	방풍
175	<i>Melissa officinalis</i>	밤	233	<i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	오미자
176	<i>Mentha arvensis</i> L. var	박하	234	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq	형개
177	<i>Morus alba</i> Linne	삼백피	235	<i>Scirpus maritimus</i> L.	삼릉
178	<i>Mucunae caulis</i>	계혈등	236	<i>Scrophularia takesimensis</i> Nakai	현삼
179	<i>Mume fructus</i>	오매	237	<i>Scutellaria baicalensis</i> Geogr	황금
180	<i>Myristica fragrans</i> Houttuyn	육두구	238	<i>Sesamum indicum</i> L.	호미인
181	<i>Nelumbo nucifera</i>	연자육	239	<i>Siegesbeckia glabrescens</i> Makino	회침
182	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner	백련	240	<i>Solanum melongena</i> L.	가지
183	<i>Oenanthe decumbens</i> Kpol	미나리	241	<i>Sophora angustifolia</i> Sieb	고삼
184	<i>Ophiopogon japonicus</i> Ker-Gaqler	맥문동	242	<i>Spilodela polvrhiza</i> L.	부평초
185	<i>Ostercum koreanum</i> Kitagawa	강활	243	<i>Stemona japonica</i> Miquel	백부근
186	<i>Ostrea gigas</i>	모려	244	<i>Styphnolobium japonicum</i> Schott	괴화
187	<i>Otella alismoides</i> L.	용설초	245	<i>Styrax tonkanensis</i> Crab	안식향
188	<i>Paeonia albiflora</i> Pallas var	적작약	246	<i>Taraxacum platycarpum</i>	민들레
189	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews	목단피	247	<i>Teucrium veronicoides</i> Max.	곽향
190	<i>Panax notoginseng</i>	삼칠근	248	<i>Thuja orientalis</i> L.	백자인
191	<i>Panomychus citri</i> McGregor	탱자	249	<i>Tiha taquetii</i> Schneid	병잎(상엽)
192	<i>Perilla frutescens</i> Britton var	소엽	250	<i>Triticum satuarum</i> Lamarck	소맥
193	<i>Perilla frutescens</i>	갯잎	251	<i>Trichosantes kirilowi</i> Maxim	파루인
194	<i>Persicae semen</i>	도인	252	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	우방자
195	<i>Petroselinum crispum</i>	향나물	253	<i>Trogopteri excrementum</i>	오령지
196	<i>Pharbitis nil</i> Choisy	흑축	254	<i>Tsuga sieboldii</i>	솔잎
197	<i>Phaseoli angularis</i>	적소두	255	<i>Typhae pollen</i>	포황
198	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr	황백	256	<i>Ulmus davidiana</i> var	유근피
199	<i>Phragmites communis</i> Trin.	노근	257	<i>Uncariae ramulus cum Uncis</i>	조구
200	<i>Phytolacca esculenta</i> Van Houtte	상유	258	<i>Viscum coloratum</i>	상기생
201	<i>Pinellia ternata</i> Breit	반하	259	<i>Vitex rotundifolia</i> L. fil	만형자
202	<i>Pinus koraiensis</i>	잣	260	<i>Zea mays</i> L.	옥발
203	<i>Piperis nigri</i> Fructus	호초	261	<i>Zingiber nigrum</i> Gaertner	익지인
204	<i>Pistachia vera</i>	파스타치오	262	<i>Zingiber officinale</i> Rosc	건강
205	<i>Plantago asiatica</i> L.	차전	263	<i>Zizyphi spinosi</i>	산조인
206	<i>Platycodon grandiflorum</i> A	길경	264	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var	대조
207	<i>Polygala tenuifolia</i> L.	원지			
208	<i>Polygonatum odoratum</i> Druce var	육죽(둥글레)			

HTS(High throughput screening) 구축

HTS를 이용한 hit 검색을 위하여 한국생명공학연구원에 설치되어 운용하고 있는 시스템을 사용하였다. Liquid handler (CyBio, Jena, Germany), multi-label counter (VICTOR2, Wallac, Turku, Finland)와 robotic arm (Thermo-CRS, Burlington, Canada) 등이 사용되었다. 이 3종의 기기는 automation software (POLARA)로 조합이 되어 있어서 적은 공간에서 대량의 물질을 검색하기에 최적으로 설치되어 있다(Fig. 1).

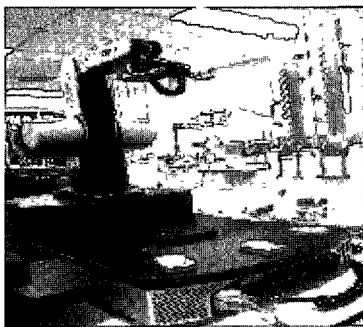


Fig. 1. Overview of HTS (high throughput screening) facility.

DPPH assay

DPPH radical 소거활성능 측정은 이전에 보고된 방법을 응용하여 실험을 하였다. 각 추출물의 시료를 10 μ L와 0.2 mM DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 190 μ L를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 다음과 같이 계산 (% inhibition = $[A_{control} - A_{sample} / A_{control}] \times 100$)을 하였다(16).

Ferric ion reducing antioxidant power(FRAP) assay

실험을 위한 반응액으로는 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 20 mM의 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 실험직전에 만들어 사용을 하였다. 반응액 (190 μ L)와 추출물 (10 μ L)을 혼합한 후 100초 간격으로 약 15분간 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 시간에 따른 상대비교를 하였으며, 재료별 활성정도는 15분 후의 값을 기준으로 하였다(17).

Hydroxyl radical (HO) scavenging assay

Hydroxyl radical 소거 활성은 Fe^{II} 와 H_2O_2 가 반응하는 Fenton 반응을 이용하여 2-deoxyribose를 산화시켜 MDA (malondialdehyde)로 분해시킬때 나오는 MDA를 530 nm에서 측정하여 활성을 알아보았다 반응액으로는 50 mM의 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 50 mM의 EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) : 50 mM 2-deoxyribose를 1 : 1 : 2의 비율로 혼합한 다음 반응액 (190 μ L)과 시료 (10 μ L)를 섞었다. 이후 100

mM phosphate buffer (pH 7.4)와 50 mM H_2O_2 를 적당량 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 방치한 다음 TCA (trichloroacetic acid)와 TBA(2-thiobarbituric acid)를 반응물에 첨가하였다 100 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 가열 후 얼음 속에서 급속히 냉각하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 정도는 시료를 넣지 않은 군을 대조군으로 % 비율로 나타 내었다(18).

Linoleic acid에 대한 항산화 활성

Linoleic acid 항산화 활성 실험은 linoleic acid를 기질로 하여 과산화 지질을 억제하는 방법을 이용하여 실험에 응용을 하였다. 과산화지질 (Linoleic acid)에 의해 Fe^{II} 가 Fe^{III} 로 산화가 되고 이때 Fe^{II} 의 반응물인 ammonium thiocyanate을 넣어 이를 ELISA에서 정량을 한 것이다. 반응은 과산화 지질 (linoleic acid)에 의해 Fe^{II} 가 Fe^{III} 로 산화되게 되고 Fe^{III} 는 ammonium thiocyanate와 반응해서 붉은색으로 변하게 되는데 이것을 490 nm에서 정량한 것이다. 시료 (10 μ L)와 linoleic acid (100 μ L)를 혼합한 다음 50 mM sodium phosphate buffer (100 μ L)를 넣고 40-60 $^{\circ}$ C의 암소에서 반응시켰다. 반응물은 각각 시간별로 취하여 반응을 정지시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(19).

Hydrogen peroxide에 의한 세포사멸 억제 실험

MTT반응은 수용성의 tetrazolium salt를 포함한 CCK-2 kit을 이용하여 세포의 미토콘드리아의 탈수소 효소 (dehydrogenase)에 의해서 환원되는 formazan의 양을 450 nm에서 측정하였다. 본 실험에서는 H_2O_2 로 산화 스트레스를 주어서 세포사멸을 유도한 다음 세포의 생존율을 이용하여 각각의 후보물질(hit)이 가지는 활성을 측정하였다(20).

결과 및 고찰

본 연구는 두 가지 목적을 가지고 실험을 수행하였다. 친식과 연관한 산화스트레스에 대하여 이를 억제할 수 있는 물질을 찾는 것이며, 또한 이러한 실험을 대량으로 하기 위해 HTS 시스템을 이용하여 보다 빠른 시간에 보다 적은 비용으로 실험을 수행하는 시스템을 구축하는데 그 목적이 있다. 먼저 비교적 간단한 DPPH와 FRAP을 이용한 항산화 실험을 HTS 시스템을 활용하여 1,000여개의 물질로부터 후보물질을 약 100여개로 줄이고자 하였다. DPPH와 FRAP 활성 실험은 매우 간단하면서도 강력한 항산화제 검색 방법으로서 많이 이용되어지고 있다.

DPPH는 화합물로서 그 자체가 매우 안정한 화합물인데 hydrogen proton radical scavenger에 의해서 색이 바뀌는 성질을 이용한 것으로 눈으로 쉽게 그 활성을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 optimal density(OD)를 측정하여 그 활성

정도를 비교할 수 있다. DPPH 항산화 활성 실험에서는 추출용매에 따라서 그 활성이 다양하게 나타났다. DW 추출물에 있어서는 오가피(*Acanthopanax senticosus*), 녹차엽(*Camellia sinensis*), 별갑(*Amydae carapax*), 빈랑(*Arecae pericarpium*), 죽여(*Bambusae caulis Taeniam*), 골담초(*Caragana sinica Rehder*) 등이 높게 나타났다. DMSO의 추출물에서는 측백(*Biotae orientalis Foliium*), 해당근(*Chaenomelis langenariae*), 계지(*Cinnamomum cassia Blume*), 산수유(*Cornus officinalis*), 비파엽(*Eryobotrya japonica Lindl*), 오배자(*Rhus javanica L.*) 등이 나타났다. Ethanol 추출물의 경우는 해당근, 조각자, 계혈등(*Mucunae caulis*), 육두구(*Myristica fragrans Houttuyn*), 연자육(*Nelumbo nucifera*), 적하수오(*Polygonum multiflorum Thumb.*) 등이 높은 활성을 보여 주었다. Methanol 추출물의 경우는 선학초(*Agrimonia pilosa Ledeb.*), 양강(*Alpiniae officinarum Rhizoma*), 소목(*Caesalpiniae lignum*), 해당근, 계피(*Cinnamomum loureiri Nees*), 육종용(*Cistanche salsa Benth et Hook*) 등이 높은 활성을 나타내었다. Ethyl acrate 추출물에서는 빈랑, 소목, 강황, 오배자, 계혈등, 호장근(*Reynoutria japonica Houtt*) 등이 항산화 활성이 높게 나타났다. 한편 쥬스의 경우는 잎당귀(*Angelica gigas Nakai*), 케일(*Brassica oleracea var*), 레드치커리(*Cichorium insybus*) 등이 활성이 높게 나타났다. 추출물질에 따라 차이를 보였으나 전체적으로 활성이 높게 나온 것으로는 해당근, 오배자, 연자육, 금앵자(*Rosae laevigatae*), 등 이었다(Fig. 2a).

FRAP 활성실험은 물질의 환원력을 측정하는 실험으로 Fe^{III}-TPTZ (Ferric tripyridyltriazine)이 Fe^{II} - TPTZ로 되는 활성을 측정한다. 실험결과 DW 추출물의 경우 곽향(*Teucrium veronicoides Max*), 소목, 오배자, 여정실(*Ligustrum obtusifolium*), 오약(*Lindera strychnifolia F. Villars.*), 목단피(*Paeonia suffruticosa Andrews*) 등이 높게 나왔다. Ethanol 추출물의 경우는 소목, 해당근, 산수유(*Cornus officinalis*), 육두구, 가자 등이 높은 활성을 보였다. Methanol 추출물의 경우는 소목, 구척(*Cibotii rhizoma*), 육종용, 산수유, 오수유(*Evodia rutaecarpa Hooker fil.*), 오배자 등이 활성을 보였다. Ethyl aceate 추출물의 경우는 녹차엽, 빈랑(*Arecae pericarpium*), 소목, 산수유, 연교(*Forsythia koreana Nakai*), 오배자 등이 높게 나왔다. 쥬스에서는 적겨자 (*Brassica juncea*), 잎당귀, 케일, 아욱 등이 활성을 나타내었다. 또한 전체적으로 추출물질에 관계없이 활성이 높게 나온 것으로는 녹차엽, 빈랑, 소목, 홍화(*Cartami flos*), 해당근, 구척 등 이었다 (Fig. 2b).

Linoleic acid 항산화 실험결과 DW 추출물에 있어서는 잣(*Pinus koraiensis*), 건포도(*Aphis gossypii Grover*), 파스타치오(*Pistachia vera*), 해바라기씨(*Crocus vernus*), 호박씨(*Cucurbita moschata*) 등이 활성이 높게 나타났다.

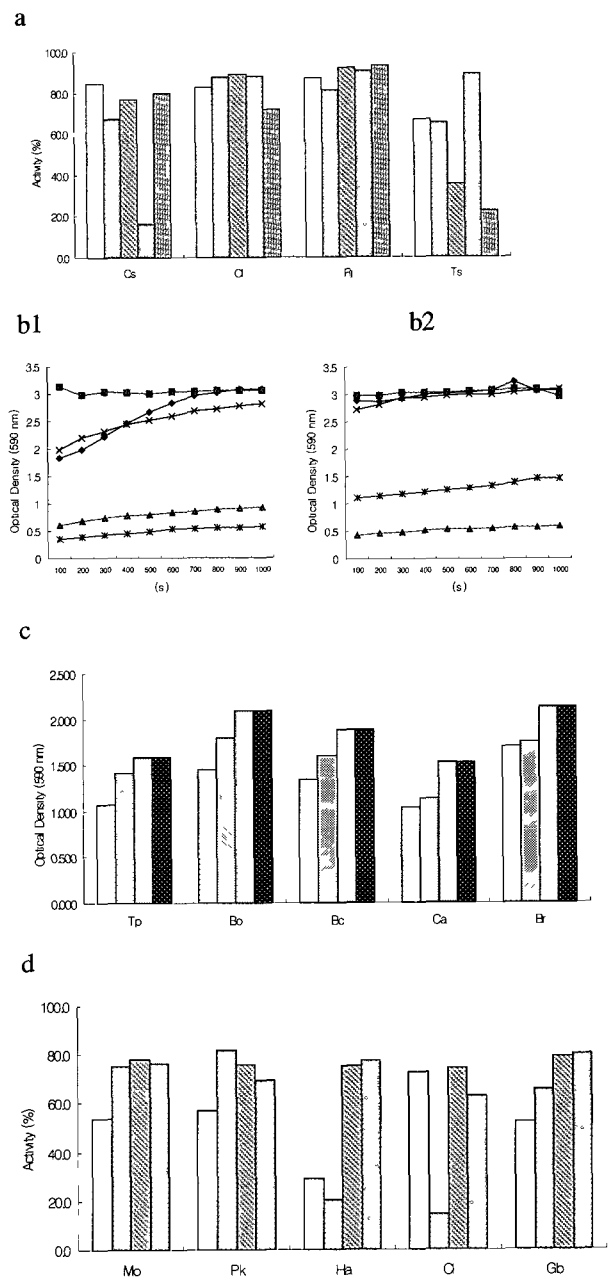


Fig. 2. Anti-oxidant activity of DW, DMSO, ethanol, methanol and ethyl aceate extraction.

a DPPH radical scavenging activity for *Camellia sinensis* (Cs), *Chaenomelis langenariae* (Cl), *Rhus javanica L* (Rl) and *Isuga sieboldii* (Ts) DW (□), DMSO (□), Ethanol (▨), Methanol (■) and Ethyl aceate (□) extraction
 b Ferric ion reducing anti-oxidant power (FRAP) assay for *Polygonum aviculare* L (b1) and *Salvia miltorrhiza* Bunge (b2) DW (—◆—), DMSO (—■—), Ethanol (—▲—), Methanol (—X—) and Ethyl aceate (—*—) extraction
 c Hydroxyl radical scavenging for *Taraxacum platycarpum* (Tp), *Brassica oleracea L* (Bo), *Brassica campestris var* (Bc), *Capsicum annuum L* (Ca), *Brassica campestris var nannosa* (Br) after 5 (□), 10 (□), 15 (▨), 20 (■) hr
 d Linoleic acid for *Melissa officinalis* (Mo), *Pinus koraiensis* (Pk), *Helianthus annuus* (Ha), *Cox lachryma-jobi var* (Cl) and *Ginkgo biloba* (Gb) DW (□), DMSO (□), Ethanol (▨) and Methanol (■) extraction

DMSO 추출물에 있어서는 잣(*Pinus koraiensis*), 건포도, 파스타치오, 땅콩(*Arachis hypogaea* L) 등에서 높은 활성을 보였다. Ethanol 추출물에 있어서는 밤(*Melissa officinalis*), 파스타치오, 해바라기씨, 호박씨, 땅콩, 은행(*Ginkgo bioba*) 등이 활성을 나타내었다. Methanol 추출물에 있어서는 밤, 파스타치오, 울무(*Cox lachryma-jobi* var), 호박씨, 은행 등이 활성을 나타내었다. 주스에 있어서는 케일, 싹추(*Brassica lee ssp*), 비타민(*Brassica campestris* var. *narinos*) 등이 활성이 높게 나왔다 (Fig. 2c).

Hydroxyl radical 소거활성 실험은 2-deoxy-D-ribose의 산화방법을 응용한 것으로 실험결과는 다음과 같이 나왔다. DW 추출물의 경우 땅콩, 울무, 파스타치오 등이 활성이 높게 나타났다. DMSO 추출물의 경우 건포도, 밤, 잣 등이 높은 활성을 보였다. Ethanol 추출물의 경우 건포도, 밤, 해바라기씨, 잣, 파스타치오 등이 활성을 나타내었다. Methanol의 경우 밤, 해바라기씨, 잣 등이 활성을 보였으며, 주스의 경우 신선초(*Angelica utilis* Makino)가 활성이 높게 나타났다 (Fig. 2d).

Hydrogen peroxide (H₂O₂)는 매우 큰 확산성을 가지고 있으며, 거의 모든 부분에 존재하는 물질이다. 또한 매우 빨리 합성이 되며, 또한 빠르게 생체 내에서 여러 세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. Hydrogen peroxide는 세포막을 침투하여 세포의 신호전달과정에 이상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 hydrogen peroxide는 lipid peroxidation을 일으킬 뿐만 아니라 cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)와 prostaglandin E2 (PGE2)의 생산을 야기하게 된다. 여기서 PGE2는 protein kinase C (PKC)-mitogen activated protein kinase(MAPK) pathway를 통한 free-radical scavengers의 생산을 야기하게 된다. 이외에도 hydrogen peroxide는 스스로 신호전달자로서의 기능을 가지며, epidermal growth factor(EGF) 같은 성장호르몬에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(21-22). Hydrogen peroxide에 의한 세포사멸을 억제하는 것으로 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. DW 추출물의 경우 해바라기씨, ethyl acetate의 경우 잣, 주스의 경우 신선초와 시금치(*Rehmannia glutinosa* Libo)에서 그 활성이 높게 나타났다 (Fig. 3).

호흡기 질환에 있어 산화스트레스와 폐의 염증현상은 정도의 차이는 있지만 거의 비슷한 패턴으로 일어난다고 보여진다(10). 이러한 관점에서 본 연구는 농산물에서 산화스트레스는 일어나게 하는 유발 물질로 알려진 superoxide를 억제하는 식품소재를 HTS 시스템을 이용하여 알아보고자 하였다. 또한 위의 실험에서 나온 몇 가지 물질을 이용하여 동물 실험모델(ovalbumin-induced model)을 만들어 실제 *in vivo*에서 control에 비교하여 어느 정도 효과가 있는지를 실험 중에 있다.

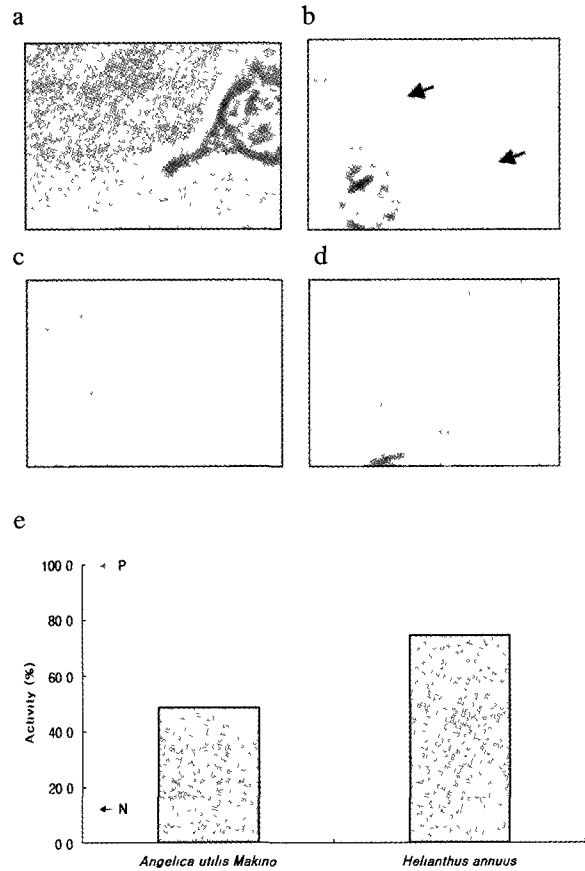


Fig. 3. MTT assay for protection effect by hydrogen peroxide.

- a No treated
- b Treated 100 μM H₂O₂ (membrane breakdown: arrow)
- c Treated 100 μM H₂O₂ with *Angelica Utilis Makino* extraction.
- d Treated 100 μM H₂O₂ with *Helianthus annuus* extraction
- e Diagram of MTT assay for protection effect by hydrogen peroxide (P, positive control, N, negative control)

요 약

천식과 관련하여 산화스트레스 (Oxidant stress)는 그 발병요인 중의 하나로 알려져 있다. 이에 본 연구는 농산물과 한약재를 이용하여 항산화 물질을 찾고자 하였으며, 시간과 비용의 단축을 위하여 HTS(high throughput screening)을 이용을 하였다. 항산화 실험과 관련하여서 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), FRAP(ferric ion reducing antioxidant power), HO(hydroxyl radical) 소거, linoleic acid에 대한 항산화 활성 등을 시행하였다. 이후 H₂O₂에 의한 산화스트레스를 이용한 세포사멸을 유도하여 세포생존을 확인해 보았다. 실험결과 해바라기씨(*Helianthus annuus*), 신선초(*Angelica utilis Makino*), 시금치(*Rehmannia glutinosa* Libo) 등이 활성이 높게 나타났다. 본 연구는 여기에서 나온 hit를 이용하여 동물모델 실험을 진행하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

참고문헌

1. Keseru, GM. (2004) The role of high throughput screening in the early stage of drug research. *Acta. Pharm. Hung.*, 74, 5-10
2. Winkler, DA. (2004) Neural networks as robust tools in drug lead discovery and development. *Mol. Biotechnol.*, 27, 139-168
3. Berg, M., Undisz, K., Thiericke, R., Moore, T. and Posten, C. (2000) Miniaturization of a functional transcription assay in yeast (human progesterone receptor) in the 384- and 1536-well plate format. *J. Biomol. Screen*, 5, 71-76
4. Berg, M., Undisz, K., Thiericke, R., Zimmermann, P., Moore, T. and Posten, C. (2001) Evaluation of liquid handling conditions in microplates. *J. Biomol. Screen*, 6, 47-56
5. Peden, DB. (2005) The epidemiology and genetics of asthma risk associated with air pollution. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 115, 213-219
6. Rabinovitch, N., Zhang, L., Murphy, JR., Vedal, S., Dutton, SJ. and Gelfand, EW. (2004) Effects of wintertime ambient air pollutants on asthma exacerbations in urban minority children with moderate to severe disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 114, 1131-1137
7. Osur, SL. (2002) Viral respiratory infections in association with asthma and sinusitis: a review. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.*, 89, 553-560
8. Lee, I., Salomon, AR., Ficarro, S., Mathes, I., Lottspeich, F., Grossman, LI. and Huttemann, M. (2005) cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J. Biol. Chem.*, 280, 6094-6100
9. Nadeem, A., Chhabra, SK., Masood, A. and Raj, HG. (2003) Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, 72-78.
10. McNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 429, 195-207.
11. Varshavskii, Bla., Trubnikov, GV., Galaktipmpva, LP., Koreniak, NA., Koledzernaia, IL. and Oberemok, AN. (2003) Oxidant-antioxidant status of patients with bronchial asthma during inhalation and systemic glucocorticoid therapy. *Ter. Arkh.*, 75, 21-24
12. Kinnula, VL. and Crapo, JD. (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 167, 1600-1619
13. Kitts, DD. and Weiler, K. (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm.*, 9, 1309-1323
14. Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Wagner, KH. and Elmadfa, I. (2004) Tocopherol composition of deodorization distillates and their antioxidative activity. *Nahrung.*, 48, 34-37
15. Huang, HY., Chang, CK., Tso, TK., Huang, JJ., Chang, WW. and Tsai, YC. (2004) Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, 55, 423-429
16. Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. and Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free. Radic. Res.*, 36, 177-187
17. Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 3396-3402
18. Okada, Y., Okajima, H., Shima, Y. and Ohta, H. (2002) Hydroxyl radical scavenging action of capsaicin. *Redox. Rep.*, 7, 153-157
19. Mun'im, A., Negishi, O. and Ozawa, T. (2003) Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 410-414
20. Liu, SQ., Saijo, K., Todoroki, T. and Ohno, T. (1995) Induction of human autologous cytotoxic T lymphocytes on formalin-fixed and paraffin-embedded tumour sections. *Nat. Med.*, 1, 267-271
21. Bae, YS., Kang, SW., Seo, MS., Baines, IC., Tekle, E., Chock, PB. and Rhee, SG. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 272, 217-221
22. Han, HJ., Lee, YJ., Park, JY., Kim, EJ., Lee, JH. and Taub, ML. (2005) Effect of EGF on hydrogen peroxidase-induced inhibition of alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells: involvement of MAPK and AA release. *J. Cell. Physiol.*, 20, 217-225

(접수 2005년 3월 11일, 채택 2005년 5월 27일)