

# 포도근 열수 추출액 및 약침액이 항산화에 미치는 효과

임성철 · 문진영\*

심혈관계질환 연구 센터 · 동국대학교 한의과대학 경혈학교실

## Antioxidant effects of the Root of *Vitis labrusca* Water and Aqua-acupuncture Solution

Seong Cheorl Lim, Jin Young Moon\*

Cardiovascular Medical Research Center and Dept. of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was purposed to investigated the antioxidant effects of water (VLWS) and aqua-acupuncture solution (VLAS) from root of *Vitis labrusca*. VLWS and VLAS was were assessed to determine the mechanisms of its antioxidant activities. The VLWS and VLAS exhibitde a concentration-dependent inhibition of DPPH free radicals. This VLWS-mediated antioxidant activity was similar to that L-ascorbic acid (vitamin C). In addition, the VLWS and VLAS showed dose-dependent free radical scavenging activity, including superoxide anions and hydroxyl radicals, using different assay systems. The VLWS and VLAS were also found to be strongly inhibited linoleic acid oxidation in a ferric thiocyanate assay (FTC) system. Finally, the VLWS and VLAS significantly prevented Fenton's reagent-induced DNA nicking.

Key words : *Vitis labrusca* root (葡萄根,) antioxidant, free radicals, deoxyribose

### 서 론

생체가 산소를 이용하는 호기성 대사의 과정에서 과산화물 을 만들고 이들의 연속적인 반응으로 인하여 세포의 유전 물질 인 DNA를 손상시키거나 암을 유발한다고 알려져 있다<sup>1-3</sup>. 세포 의 노화와 관련이 있는 이러한 물질을 활성산소종 혹은 자유기 (free radicals)라고 일컫는다. 이러한 활성산소가 세포막의 형성 불능이나 파괴를 일으키고, 축적되는 가역 혹은 비가역 적인 일련의 과정을 통하여 인체는 여러 가지 질병을 유발한다고 알려져 있다<sup>4</sup>. 따라서 원인 물질을 생성하는 산화물의 생성을 억제하 기 위하여 천연물 및 식물자원에서 추출한 항산화제 (antioxidants)의 개발물이 전 세계적으로 유효하게 사용되고 있 다. 천연물에서 추출한 항산화제 혹은 항산화 물질은 산화속도를 억제하는 물질로 그 기능에 따라 크게 둘로 구분하는데, 우선 1 차 혹은 연쇄반응 차단 항산화제 (chain breaking antioxidants) 로 지질 자유기 (lipid radical)와 반응하여 이를 안정한 물질로 전환 시키는 것이고, 다음으로 방어적 항산화 개념 (preventive

antioxidants)으로 항산화 물질의 여러 기작을 통하여 산화 연쇄 반응의 개시 속도를 지연시키는 것이다<sup>1</sup>. 항산화 물질로 널리 알려진 식품 첨가 천연 항산화제로는 tocopherol, flavone, quercetin과 일부 vitamin 등이 보고되어 있고, olanzapine과 합성 항산화제인 BHT, BHA, TBHQ 등이 있다<sup>5-13</sup>. 그러나 단일 항산화제의 경우에는 그 효능이 충분하지 않고, 복합물의 경우에는 부작용이 있다는 점에서 엄격하게 제한이 되고 있다<sup>14</sup>. 따라서 인체에 독성이 없고 이미 임상 처방에서 안정성이 검증된 한약 자원에서의 천연 항산화 물질 개발이 필요하다고 사료된다.

포도근은 포도나무의 뿌리로서 한방에서는 이를 달여 마시 면 구역질과 땀꼭질이 멎고, 임신부의 태기가 명치로 치밀 때 마 시면 곧 내려간다고 하였다<sup>15</sup>. 또한 열매의 성질은 평하고 맛은 감하며, 독이 없다고 하였다. 하지만 포도의 열매에서 유용한 성분을 추출하여 항산화 및 항암에 관련된 보고<sup>16</sup>는 많으나, 포도 근의 경우 최근에 일부 보고<sup>17-18</sup> 되어 있을 뿐 극히 미흡하다.

따라서 본 논문에서는 포도근을 재료로 하여 열수추출액 (VLWS)과 약침액 (VLAS)을 조제하고, 추출물의 항산화 능력을 검증하기 위하여 DPPH free radical, superoxide anions ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) 및 lipid peroxidation을 저해하는 정도 를 측정하고자 하였다. 그리고 hydrogen peroxide에 의한 DNA

\* 교신저자 : 문진영, 경북 경주시 석장동 707 동국대 한의과대학 경혈학교실

· E-mail : ampmoon@dongguk.ac.kr · Tel : 054-770-2665

· 접수 : 2005/11/30 · 수정 : 2006/01/03 · 채택 : 2006/01/30

초나선구조를 강제 분절 할 경우 포도근 열수추출액 및 약침이 이를 방어하는 정도를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

본 실험에 사용된 모든 plastics 제품은 Falcon Labware (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)사로부터 구입하여 사용하였으며, L-ascorbic acid (vitamin C), deoxyribose, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>), hydrochloride, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hypoxanthine, linoleic acid, nitro blue tetrazolium (NBT), trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), tris[hydroxymethyl] aminomethane, xanthine oxidase는 Sigma 사 (St. Louis, Mo, U.S.A)에서 구입하였다. Agarose, ethidium bromide (EtBr)과 6X orange-blue dye는 Promega사 (Promega, Madison, WI) 제품을 이용하였으며, 그 외에 사용한 시약들은 모두 Merck (Merck KGaA, Germany)사 및 Junsei (Junsei Chemical Co. Ltd. Japan)사의 특급 제품을 구입하여 사용하였다.

### 2. 재료 및 추출액의 제조

#### 1) 열수추출액 (Vitis labrusca root water-extract solution, VLWS)

본 실험에서 사용한 포도근(葡萄根)은 동국대학교 한의과대학 부속 한방 병원에서 정선된 것을 구입하였으며, Voucher specimen은 동국대학교 한의과대학 경혈학교실에 보관되어 있다. 포도근 열수 추출액은 60 g의 재료를 작은 조각으로 분쇄하고, 500 ml의 증류수를 가하여 3 시간 동안 80 °C에서 전탕 추출하였다. 추출물을 4°C, 3,000rpm에서 10 분간 원심분리 하여 침전물을 제거 하고, 회수된 상등액을 filter paper (No.#1, Whatman®, Germany)를 이용하여 여과 하였다. 여액은 rotary evaporator (N-1000, EYELA, Japan)에서 50 ml 까지 농축하였으며, 동결건조 (Labconco, 77530, U.S.A) 방법으로 분말을 회수 하였다 (회수율 6.5%).

#### 2) 약침액 (Vitis labrusca root aqua-acupuncture solution, VLAS)

포도근 약침액은 수제 알콜침법<sup>19)</sup>을 근거하여 조제하였다. 포도근 60 g을 조말하여 500 ml의 증류수를 가한 뒤 3 시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 전량 200 ml가 되도록 감압 농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여별하고, pH 7.4로 적정 한 후 저온에서 24 시간 방치하여 membrane filter로 여과하였다. 이를 동결 건조 하여 최종 3.2%의 분말을 회수하여 실험에 사용하였다.

### 3. DPPH free radical의 제거 활성 측정

포도근 열수추출액 및 약침액의 DPPH 자유기 소거 효과를 검증하기 위하여 Gyamfi et al<sup>20)</sup>의 방법을 따라 실험하였다. 먼

저 50 µl의 VLWS와 VLAS를 여러 농도로 증류수에 녹이고 (0.25 to 8 mg/ml), 여기에 1 ml의 0.1 mM DPPH (dissolved absolute ethanol) 용액과 450 µl의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 작 섞었다. 포도근-DPPH 혼합물을 실온에서 30 분간 정치 한 후 분광광도계 (UV2120<sup>+</sup>, MECASIS, Korea)에서 흡광도 517 nm 측정 하였다. 실험에 사용한 대조군은 L-ascorbic acid이며, DPPH radical의 억제율은 다음과 같은 공식에 의하여 산정하였다.

$$\% \text{ inhibition} = [(Abs_{517} \text{ of control} - Abs_{517} \text{ of sample}) / Abs_{517} \text{ of control}] \times 100$$

### 4. Superoxide anions의 제거 활성 측정

VLWS 및 VLAS의 superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) 제거 활성은 Gotoh et al<sup>21)</sup>의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 우선 다양한 농도의 VLWS 및 VLAS를 100 µl 의 30 mM EDTA (pH 7.4)와 50 mM의 NaOH에 녹인 30 mM hypoxanthine 10 µl, 그리고 100 µl의 3 mM nitro blue tetrazolium (NBT)를 시험관에서 잘 섞어 주었다. 이 용액을 실온에서 3 분간 정치시키고, 100 µl의 0.5 U/ml xanthine oxidase 첨가한 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 최종 부피를 3 ml로 조정하였다. 혼합물을 실온에서 20 분간 반응시키고, 흡광도 560 nm에서 제거 활성을 측정하였다.

### 5. Deoxyribose의 활성 변화 측정

VLWS 와 VLAS의 직접적인 hydroxyl radicals (non-site-specific scavenging assay)의 제거효과 및 chelate iron ions 제거 측정 (site-specific scavenging assay)은 Halliwell et al<sup>22)</sup>의 방법을 고려하여 실험하였으며, 포도근 열수추출액 및 약 침액의 전산화 유도효과 (pro-oxidant effect) 억제 측정은 위의 방법을 일부 수정하여 사용하였다.

#### 1) Non-site-specific scavenging assay (hydroxyl radicals directly, ·OH)

50 µl의 시료를 reaction buffer (0.1 mM FeCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2.5 mM deoxyribose, and 0.1 mM L-ascorbic acid, pH 7.4) 1 ml과 섞고, 이를 37°C에서 1 시간 동안 반응 시켰다. 그리고 1 ml의 0.5 % TBA in 0.025 M NaOH 와 1 ml의 2.8% TCA 를 첨가한 후 80°C 항온수조에서 30 분간 정치하였다. 마지막으로 혼합물을 4°C 얼음에서 반응을 정지 시키고, 흡광도 532 nm에서 ·OH의 제거 효과를 측정하였다.

#### 2) Site-specific scavenging assay (chelate iron ions)

VLWS 및 VLAS의 chelate iron ions과 hydroxyl radicals generation의 간섭을 측정하는 실험은 위 non-site-specific scavenging assay에서 사용된 reaction buffer에서 EDTA를 제거 시킨 후 이를 반응하여 실험하였다.

#### 3) VLWS 및 VLAS의 전산화 유도 억제 효과

Fe<sup>3+</sup>-EDTA complex가 Fe<sup>2+</sup>-EDTA complex로 활성화되어 산 화가 진행되는 것에 VLWS 및 VLAS가 미치는 간섭을 확인하기 위하여, non-site-specific assay에 사용된 혼합물에 L-ascorbic acid를 제외하고 활성을 측정하였다. 포도근 열수추출액 및 약침

액의 전산화 유도율은 다음과 같은 공식에 따라 구하였다.

$$\% \text{ stimulation} = [(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{control}}) / OD_{\text{control}}] \times 100.$$

6. Linoleic acid를 이용한 지질과산화 억제 측정

지질과산화를 억제하는 VLWS 및 VLAS의 활성을 검증하기 위하여 ferric thiocyanate assay<sup>23)</sup>를 실시하였다. 120 μl의 농도별 시료 (0.1 to 1 mg/ml)와 2.88 ml의 희석된 linoleic acid (25 mg/ml 99% ethanol), 그리고 40 mM의 phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 최종 부피를 12 ml로 조정하였다. 이를 40℃, dark screw cap 시험관에서 최종 72 시간 동안 반응하게 하였다. 시료의 지질과산화 억제 활성 측정은 9.7 ml의 75% ethanol이 들어있는 시험관에 매 24, 48 그리고 72 마다 혼합 용액 100 μl를 분주하고, 100 μl의 ammonium thiocyanate (300 mg/ml distilled water)와 100 μl의 ferrous chloride (2.45 mg/ml 3.5% HCl)를 각각 첨가한 후 실온에서 3분간 정치하여, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. DNA nicking 억제 효과 분석<sup>11)</sup>

DNA nicking은 supercoiled pBR322로부터 Plasmid Miniprep Kit (JBI and Welgene, Deagu, Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 회수하여 사용하였다. 먼저 0.5 μg의 정제된 DNA에 Fenton's reagents (30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.05 mM ascorbic acid, and 0.08 mM FeCl<sub>3</sub>)를 첨가하고, 각기 다른 농도의 VLWS와 VLAS을 처리하였다. 그리고 최종 부피를 20 μl로 조절하고, 37℃에서 30분 동안 반응 시켰다. VLWS 및 VLAS의 plasmid DNA 분절 억제 효과를 관찰하기 위하여 1.2% agarose gel에 ethidium bromide 염색법을 실시하여 분석하였다.

8. 통계학적 처리

실험 결과는 평균값 및 표준오차 (mean±S.D.)로 표기하였으며, 각 실험은 세 번씩 (n=3) 실시하였다. 통계적 유의성은 Student' t-test (Sigma Plot procedure, ver. 6.1 for Windows)를 행하여 p 값이 0.05 이하인 경우에만 유의성을 인정하였다.

실험결과

1. DPPH radical의 소거 효과

VLWS 및 VLAS의 자유기 소거 효과를 측정하기 위하여 DPPH radical을 이용한 실험에서 VLWS 및 VLAS는 광범위한 제거 활성을 나타내었다. 시료 0.25 에서 8 mg/ml을 처리하였을 때 VLWS는 각각 12, 25, 42, 77, 82, 81%의 소거 활성을 보였으며, VLAS에서 6, 12, 23, 41, 71, 87%의 우수한 제거 성능을 나타내었다. 이는 DPPH radical의 소거에 양성 대조군으로 잘 알려진 L-ascorbic acid (vitamin C)의 소거 활성과 비교하였을 때 비슷한 효과를 보였으며, 특히 포도근 추출물의 농도에 의존적인 소거 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 그러나 VLWS 및 VLAS는 8 mg/ml 이상의 고농도에서 더 높은 소거 활성은 발견 되지 않았다(data not shown).

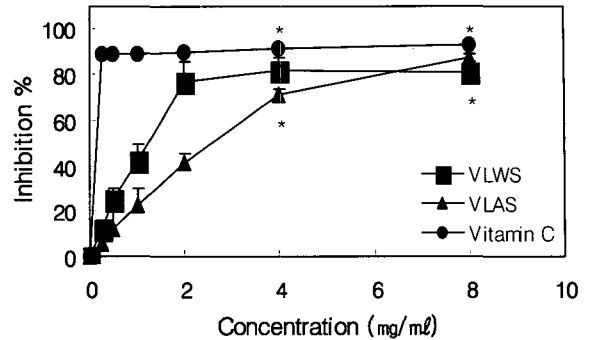


Fig. 1. Free-radical scavenging activities of VLWS and VLAS extracts measured using the DPPH assay. The direct scavenging activities of VLWS (■), VLAS (▲) and ascorbic acid (●) on DPPH radicals is expressed as the inhibition %. The concentrations tested ranged from 0.25 to 8 mg/ml. The results are the means of three separate experiments. \* p <0.05 ; compared with the control group.

2. Superoxide Anions의 소거 효과

VLWS와 VLAS 각각의 superoxide anions 소거 활성은 xanthine oxidase-mediated에 의한 hypoxanthine의 감소로써 생성되는 superoxide anions에 대한 NBT 환원능으로 측정하였다. Superoxide는 생체 내에서 다양한 산화계 효소를 변환시키거나 활성화 하는 것으로 알려져 있는 것에 반하여, VLWS 및 VLAS는 이를 매우 효과적으로 방어 하는 것으로 나타났으며(Fig. 2), 이상의 결과는 superoxide radicals을 강하게 저해하는 BHA와 유사한 것으로 관찰 되었다 (data not shown). 특히 VLWS가 VLAS 보다 우수한 소거 효과를 보였다(8 mg/ml, 82%).

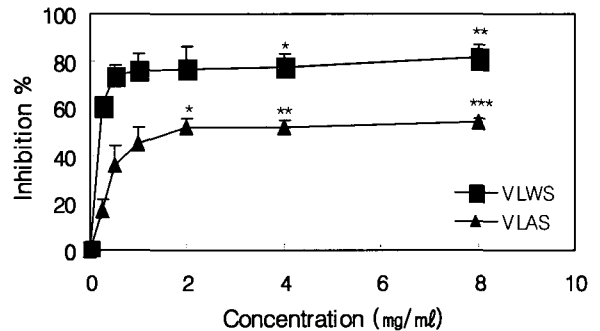


Fig. 2. Inhibitory effects of VLWS and VLAS extracts on NBT reduction. The inhibitory effect of VL extracts were tested by monitoring NBT reduction caused by superoxide anions using the hypoxanthine-xanthine oxidase system, as described in the Materials and Methods section. The results are expressed as the mean values of triplicate experiments. \* p <0.05, \*\* p <0.01, and \*\*\* p <0.005 ; compared with the control group.

3. Hydroxyl Radical의 소거 효과

VLWS와 VLAS의 항산화 활성을 DPPH와 superoxide의 소거 효과에서 살펴본 바와 같이 포도근 추출물의 hydroxyl radical 소거능을 측정된 결과, VLWS와 VLAS는 다양한 농도에서 직접적으로 hydroxyl radical을 감소시켰다(Fig. 3). 또한 chelating metal ions에 의하여 변화 되는 hydroxyl radical의 소거능 측정에서는 매우 높은 소거가 관찰 되었다(Fig. 3). Fig. 3에서

나타낸 바와 같이 VLWS 및 VLAS는 농도 의존적인 저해 효과를 보였다. VLAS 보다 VLWS에서 소거능이 높게 나타났으며, VLWS의 경우 최고 74%의 소거능이 관찰 되었다. VLWS와 VLAS에 의한 전산화 유도를 제어하는 효과를 관찰한 결과 포도근 추출물의 모든 농도에서 pro-oxidant 효과는 관찰 되지 않았다(Table 1).

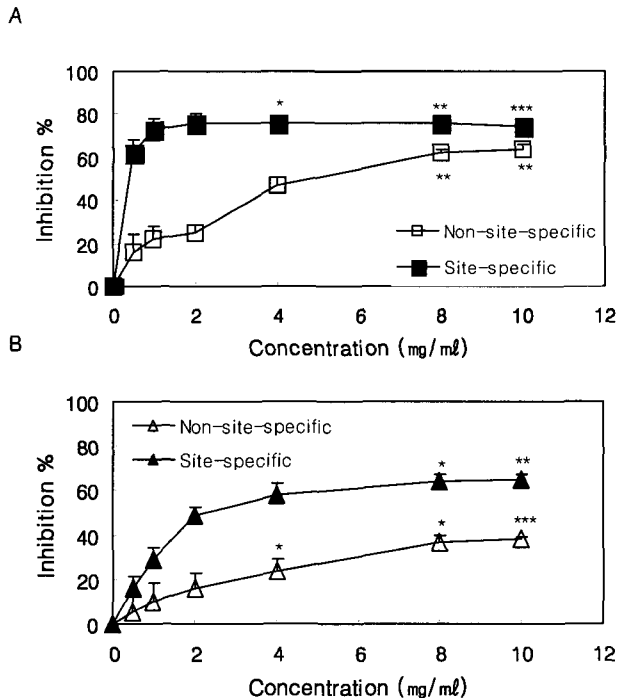


Fig. 3. Inhibitory effects of VLWS and VLAS on hydroxyl radical-mediated deoxyribose degradation. Hydroxyl radicals were generated by Fenton's reaction using a deoxyribose assay system, and the non-site-specific (■,▲) and site-specific (□,△) scavenging activities of hydroxyl radicals by VLWS and VLAS are expressed as the inhibition % . A and B show the water extract and aqua-acupuncture solution, respectively. The concentrations of VL extracts tested ranged from 0.5 to 10 mg/ml. The results are the means of three separate experiments. \* p <0.05, \*\* p <0.01, and \*\*\* p <0.005, ; compared with the control group.

Table 1. Pro-Oxidant Effects of VLWS and VLAS on Iron-Dependent Hydroxyl Radical Generation.

amount of VAWS and VAAS extracts (mg/ml)	VLWS		VLAS	
	optical density (A532 nm)	% stimulation	optical density (A532 nm)	% stimulation
control	0.041 ± 0.005		0.053 ± 0.004	
0.5	0.040 ± 0.008	0	0.052 ± 0.003	0
1	0.041 ± 0.010	0	0.050 ± 0.0011	0
2	0.041 ± 0.011	0	0.051 ± 0.010	0
4	0.038 ± 0.012	0	0.050 ± 0.005	0
8	0.018 ± 0.005	0	0.051 ± 0.005	0
10	0.019 ± 0.006	0	0.046 ± 0.007	0

Experiments were conducted essentially as described by Halliwell et al., except that L-ascorbic acid was omitted. The results are the mean values of three separate experiments.

4. Linoleic acid 지질과산화의 억제 효과

지질막을 구성하는 불포화 지방산의 일종인 linoleic acid의 산화를 억제하는 효과를 관찰하기 위하여 포도근 추출물을 농도별로 처리하고 72 시간 동안 반응하였을 때, VLWS와 VLAS는 농도 및

시간에 의존적으로 산화를 억제하는 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

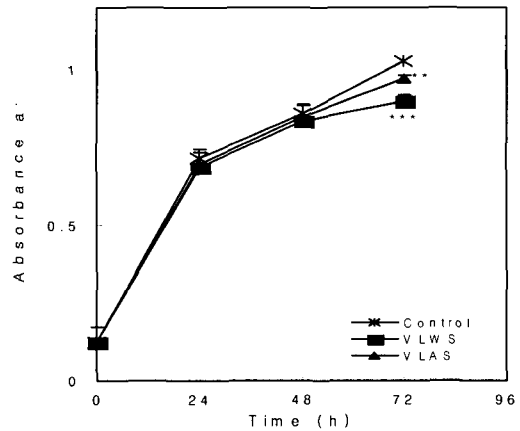


Fig. 4. Inhibitory effects of VLWS and VLAS extract on hydroxyl radical-mediated linoleic acid oxidation. The concentrations tested 1 mg/ml. Absorbance of the extracts from Vitis labrusca root by FTC method with increasing incubation time, \* p <0.05, \*\* p <0.01, and \*\*\* p <0.005, ; compared with the control group.

6. Fe<sup>3+</sup>-의존성 DNA 분절의 억제 효과

포도근 추출물이 Fe<sup>3+</sup>-의존성 hydroxyl radicals에 의한 DNA 분절을 억제하는 효과를 측정 한 결과, VLWS 및 VLAS는 처리 농도에 유의성 있는 nicking을 일부 저해를 하였다. (Fig. 5B, 5C). Fenton's reagent 반응 시간에 의한 pBR322 plasmid DNA의 분절 정도를 관찰하기 위한 예비 실험에서는 시간에 의존적인 분절 증가 현상이 관찰되었으며 (Fig. 5A), super-coiled DNA는 시간 경과에 딸 각각 double-stranded 및 single-stranded 형태를 나타내었다.

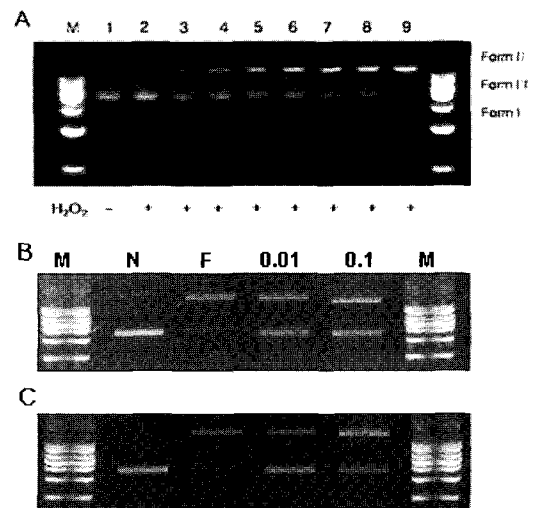


Fig. 5. Inhibitory effects of VLWS and VLAS on DNA nicking caused by hydroxyl radicals. The DNA nicking reaction were initiated by the addition of 0.5 μg of pBR322 plasmid DNA. (A) Lanes 2 through 9 represent the results from the mixture incubated for 0, 5, 10, 20, 30, 45, 50 and 60 min, respectively. Lanes M and 1 show the 1 kb size maker and native plasmid DNA, respectively. Form I : Supercoiled DNA, Form II : Single strand nicking from, Form III : Double strand nicking form. (B, C) Lanes M and N show the size maker and native plasmid DNA, respectively. Lane F show the only Fenton's reagent treatment. Lanes 0.01 and 0.1 show the VL extracts treated range from 0.01 to 0.1 mg.

## 고찰

생명체의 성장과 동시에 진행되는 발육과 성장, 성숙과 쇠퇴의 생물학적 과정에서 행태적·기능적 퇴축, 그리고 예비력과 적응력의 저하로 사망에 이르게 되는 보편적 생리 현상을 노화라고 정의한다<sup>24)</sup>. 이러한 일련의 노화 반응과 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 상호 밀접한 관계를 이루고 있으며, 자외선에 노출된 경우와 방사선, 흡연, 비정상적 식습관, 음주 및 약물복용 등으로 인하여 자유기 (free radicals)을 생성한다고 알려져 있다<sup>25)</sup>.

일반적으로 체내에서 발생하는 활성산소종에는 superoxide radical( $O_2 \cdot^-$ ), hydroxyl radical( $\cdot OH$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) 등이 잘 알려져 있는데, 이들 활성산소종은 원자를 이루고 있는 최외곽의 전자가 소실되거나 과포화된 상태에서 이를 벗어나 안정화되기 위한 과정에서 높은 반응성을 갖는다. 따라서 활성산소종은 세포막의 불포화지방산들과 결합하여 지질과산화 (lipid peroxidation) 반응을 일으키거나, 세포 내의 거대분자들과 반응하여 세포의 산화적 손상 (oxidative damage)을 야기함과 동시에 노화의 주요 원인이 된다고 알려져 있다<sup>26)</sup>.

노화를 방지하거나, 산화적 스트레스를 방어하기 위한 연구는 천연물과 식물자원을 이용하여 실험적으로 다양한 접근을 해왔다. 특히 포도과 (Vitaceae)의 식물에서 항산화 및 암예방, 항암, 그리고 동맥경화증 (arteriosclerosis disease) 등에 활발한 연구가 진행되어 왔다<sup>16,27)</sup>. 그러나 포도과의 뿌리에 대한 논문은 머루 및 까마귀머루<sup>17,18)</sup>에서 추출한 resveratrol을 대상으로 보고되었을 뿐 대체로 미흡하다고 볼 수 있다.

따라서 본 실험 논문에서는 한방에서 이용되는 약재 중 포도근 열수추출액 (VLWS) 및 약침액 (VLAS)을 이용하여 다양한 활성산소의 활성을 억제하고, 지질과산화 및 DNA의 분절을 억제하는 효과를 측정하고자 다음과 같은 실험을 진행하여 유의한 결과를 얻었다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 불균형한 구조를 가진 free radical으로, 액체 상태에서 짙은 보라색을 띠다가 수소 원자를 얻어 안정된 구조로 변형하게 되면 색깔을 잃게 되는 성질을 가진다<sup>28,29)</sup>. 이러한 성질을 이용하여 포도근 추출물의 DPPH radicals 소거능을 측정된 결과, VLWS 및 VLAS에서 모두 높은 소거 활성을 나타냈다. 특히 VLWS는 DPPH 억제제의 대표적 물질인 vitamin C와 비교하였을 때 유사한 효과를 나타내었다.

Superoxide anions는 일상에서 흔히 접하는 X-ray나 자외선 등에 노출 되었을 때 생체에서 발생하는 보다 강력한 활성산소종으로 세포 내의 superoxide는 주로 미토콘드리아 (mitochondria) 또는 마이크로솜 (microsome), 그리고 핵막 등의 세포 소기관에서 생성되며, 자체적으로 더욱 강한 hydroxyl radical을 생성시키는 전구물질로서 중요한 역할을 담당하게 된다. 이러한 과정을 통하여 세포막 및 세포 거대 분자에 직접적인 손상을 일으킨다고 알려져 있다<sup>30)</sup>. 포도근은 superoxide anions radical을 강하게 억제 하였으며, VLWS는 최고 8 mg/ml의 농도에서 82%를 억제

하는 높은 활성을 나타내었다. 따라서 superoxide radical에 의한 세포 내 손상을 막아 줄 것으로 기대된다. 또한 지질과산화에 관련된 일련의 반응 매개를 억제할 것으로 사료된다.

다음으로 hydroxyl radical에 의하여 유도되는 deoxyribose의 감소는 site-specific 및 non-site-specific assays 모두에서 VLWS 및 VLAS는 강력한 억제 효과를 나타내었다. 특히 VLWS가 VLAS보다 더 높은 저해 활성을 보였으며, chelate iron ion에 의한 deoxyribose의 감소 억제가 hydroxyl radical을 직접적으로 소거 하는 것 보다 더 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는  $Fe^{3+}$ -의존성 hydroxyl radical의 발생을 억제하는 강력한 증거로 보인다. 또한 포도근 추출물이  $Fe^{3+}$ -EDTA complex에서  $Fe^{2+}$ -EDTA complex로 매개하는 산화 능력을 저농도 에서부터 고농도까지 다양하게 실험한 결과 유도 반응을 관찰할 수 없었다.

지질의 과산화반응 (lipid peroxidation, LPO)은 분자상의 산소가 세포의 지질막을 구성하는 지방산에 부과되는 반응이며, 주로 세포막을 구성하고 있는 인지질의 불포화 지방산에서 수소를 탈취함으로써 fatty acid radical이 생성되며, 이렇게 활성화된 지질은 산소 분자와 결합하는 일련의 반응을 통하여 연쇄적인 지질과산화물 (hydroperoxide)을 형성하게 된다. 본 연구에서는 이러한 지질과산화 작용의 연쇄적인 반응을 VLWS 및 VLAS가 억제하는 효과를 측정된 결과, 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 낮은 지질 산화 정도를 나타내었다.

한편, 활성산소종은 세포내 유전 물질인 핵산 및 리보핵산 (DNA, RNA)에 손상을 일으키는 영향을 미치기도 한다. 이러한 DNA 손상은 세포 내 유전적 결함을 가져와 돌연변이를 일으키거나 각 종 암을 유발하는 경우도 있으며, 정상적 생체 대사를 저해하여 세포막 형성의 불능이나 파괴, 심혈관 질환, 만성염증 질환, 호흡기 질환, 자가면역 질환 등 여러 가지 질병을 유발하고, 노화와 치매에도 관계한다고 알려져 있다. 이러한 유전체에 활성산소가 미치는 나쁜 영향을 방어하는 정도를 측정하기 위하여 pBR322로부터 super-coil로 형성된 DNA를 얻고, 포도근 추출물을 처리하여 유전체의 손상 정도를 관찰하였다. Fig. 5 A는 Fenton's reagent를 처리하고 시간 경과에 따른 DNA 손상 정도를 관찰한 것으로 Form I의 경우는 super-coil DNA로서 정상 형태를 가지는 것이고, Form II는 활성산소에 의하여 완전히 분절된 DNA, 그리고 Form III는 single-stranded nicked DNA로 진행되기 위한 double-stranded nicked DNA다. 이러한 진행 단계를 방어하는 VLWS 및 VLAS의 효능은 Fig. 5B에서 보이는 바와 같이 농도별 시료에 따라 Form I을 증가시키는 효과를 관찰할 수 있었다. 즉, VLWS 및 VLAS는 활성산소종에 의한 DNA 손상을 저해하거나, 이를 강력하게 막아주는 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 살펴본 것처럼 VLWS 및 VLAS는 다양한 활성산소종을 효과적으로 제거하거나 이들의 활성을 저해하였고, 지질과산화 및 DNA의 분절을 유의성 있게 방어 하였다. 현재 본 교실에는 VLWS를 대상으로 암예방 및 항암 효과 등을 실험 중에 있으며, 향후 포도근의 성분 분리 정제 및 동맥경화증을 대상으로 세포 실험을 계획하고 있다.

## 결 론

VLWS 및 VLAS가 항산화에 미치는 효과를 관찰한 결과, 다음과 같은 성적을 얻었다. VLWS 및 VLAS는 DPPH free radical을 높은 소거 효과를 나타내었으며, 양성 대조군인 L-ascorbic acid와 비슷한 결과를 보였다. Superoxide anions의 소거 활성을 포도근 추출물로 실험한 결과, VLWS 및 VLAS에서 모두 매우 강한 억제 경향을 나타내었으며 VLAS에서 보다 VLWS에서 더 우수한 것으로 관찰 되었다. Hydroxyl radical을 직접적으로 소거하는 능력을 살펴본 것을 때 포도근 추출물은 높은 소거 활성을 나타내었다. 특히 hydroxyl radical의 generation을 방해하는 효과를 관찰한 경우 직접적인 radical의 소거 능력보다 더 우수한 것으로 나타났으며, 두 가지 결과 모두에서 VLWS이 VLWS보다 우수한 소거능을 보였다. VLWS 및 VLAS가 산화를 유도하는 현상을 관찰하기 위하여 실험을 하였을 때 모든 농도에서 유도 반응이 관찰 되지 않았다. 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용하여 포도근 추출물의 지질과산화물 억제 효과를 관찰 하였을 때 VLWS 및 VLAS에서 모두 시간에 의존적으로 이를 저해 하였다. 마지막으로 super-coiled DNA의 분절을 방어하는 기작을 관찰하기 위하여 Fenton's reagent 및 시료를 농도별로 처리하였을 때 VLWS 및 VLAS는 DNA의 분절 현상을 일부 효과적으로 방어하는 것을 관찰 할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터육성사업 (과제번호 R13-2005-013-01000-0)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Barnes, A.L. Toxicological and biochemistry of BHA, BHT. J. Am. Oil Chem. Soc. 52, 59-64, 1975.
- Chung, I.M., Kim, K.H and Ahn, J.K. Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. Kor. J. of Med. Sci. 6, 311-322, 1998.
- Hofeman, D.G. and Hoekstra, W.G. Protein against carbon tetrachloride induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E selenium and methionine as measured by ethan evolution. J. Nutr. 107, 667-670, 1977.
- Yagi, K. Lipid peroxides and human disease. Chem. Phys. Lipids. 45, 337, 1987.
- Bishov, S.J., Masuoka, Y. and Kapsalis, J.G. Antioxidant effect of spices herbs and hydrolyzates in freeze dried model system synergistic action with synthtic antioxidants. J. Food Proc. Preserv. 1, 153-159, 1977.
- Chang, S.S., Biserka, O.M., Olive, A.L. and Huang, C.L. Natural antioxidants from rosemary and sage. J. Food Sci.

- 42, 1102-1107, 1977.
- Fukuda, Y., Osawa T., Kawagishi, S. and Namiki, H. Oxidative stability of foods fried with sesame oil. N. S. K. G. 38, 28-30, 1988.
- Kim, S.W., Kim, E.S. and Kim, Y.S. Studies on the polysaccharide extracted from Ganderma Lucidum. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 24, 147-150, 1995.
- Kim, Y.J., Kim, C.K. and Kwon, Y.J. Isolation of antioxidative components of Perillae semen. Kor. J. Food Sci. Technol. 29, 38-44, 1997.
- Naom, M., Gestetner, B., Bondi, A. and Birk, Y. Antioxidantive and antihemolytic of sobean isoflavones. J. Agric. Food Chem. 24, 1174-1176, 1976.
- Lee, J.C., Kim, H.R., Kim, J. and Jang, Y.S. Antioxidant property of ethanol extract of the stem of Opuntia ficus-indica var. Saboten. J. Agric. Food Chem. 50, 6490-6496, 2002.
- Lin, C.C., Wu, S.J., Chang, C.H. and Ng, L.T. Antioxidant activity of Cinnamomum cassia. Phytother. Res. 17, 726-730, 2003.
- Wei, Z., Bai, O., Richardson, J.S., Mousseau, D.D. and Li, X.M. Olanzapine protects PC12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. J. of Neuro. Res. 73, 364-368, 2003.
- Rohrdanz, E., Bittner, A., Taran-Thi Q. and Kahl, R. The effect of quercetin on the mRNA expression of different antioxidant enzymes in hepatoma cells. Arch. Toxicol. 77, 506-510, 2003.
- 許 凌 : 東醫寶鑑, 서울, 법인문화사, p 3448-3449, 2005.
- Marie-Veronique, C., Jayshreekumari, L.H., Sanaul-Haq, C., and Shazib, P. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. Blood. 3, 996-1002, 1998.
- Kai-Sheng, H., Mao, L. and Gui-Fang, C. Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of Vitis amurensis and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. Phytochemistry. 58, 357-362, 2001.
- Yu-Ling, H., Wei-Jern, T., Chien-Chang, S. and Chien-Chih, C. Resveratrol derivatives from the roots of Vitis thunbergii. J. Nat. Prod. 68, 217-220, 2005.
- 錢百炎 : 中草藥主射劑, 上海, 上海科學技術出版社. pp 71-132, 1981.
- Gyamfi, M.A., Yonamine, M. and Aniya, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. Gen. Pharmacol. 32, 661-667, 1999.
- Gotoh, N. and Niki, E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. Biochim. Biophys. Acta.

- 1115, 201-207, 1992.
22. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Aruoma, O.I. The deoxyribose method: simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165, 215-219, 1987.
  23. Osawa, T., and Namiki, M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biolog. Chem.* 45, 735-740, 1981.
  24. 沈吉浩 : 老化의 概念과 豫防, 서울, 成文出版社, pp 15-17, 1987.
  25. Ames, B.N., Cahcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. A Hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6858-6862, 1981.
  26. Aruoma, O.I., Kaur, H. and Halliwell, B. Oxygen free radicals and human disease. *J. Roy. Soc. Health.* 111, 172-177, 1991.
  27. Pendurthi U.R., Williams J.T. and Rao, L.V. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells : A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 19, 419-426, 1999.
  28. Philip M. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211-219, 2004.
  29. Abdalla, A.E and Roozen, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem.* 64, 323-329, 1999.
  30. 大柳善彦 : SOD よ活性酸素調節濟よの 薬理作用 よ 臨床應用, 東京, 日本醫學館, p 9, 1989.