

산수유로부터 추출한 ursolic acid가 과산화수소로 손상된 HEI-OC1 청각세포보호에 미치는 영향

유현희 · 서세정¹ · 허종문¹ · 박래길² · 소홍섭² · 전병훈³ · 유용욱^{1*}

군산대학교 식품영양학과, 1: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실 · VCRC,
2: 원광대학교 의과대학 미생물학과 · VCRC, 3: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Protective Effect of Ursolic Acid from Corni fructus on the Hydrogen Peroxide-induced Damage of HEI-OC1 Auditory Cells

Hyeon Hee Yu, Se Jeong Seo¹, Jong Moon Hur¹, Rae Kil Park², Hong Seob So²,
Byung Hun Jeon³, Yong-Ouk You^{1*}

Department of Food and Nutrition, Kunsan National University,

1: Department of Oral Biochemistry & Vestibulocochlear Research Center, School of Dentistry, Wonkwang University,

2: Department of Microbiology & Vestibulocochlear Research Center, School of Medicine, Wonkwang University,

3: Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The fruits of *Cornus officinalis* have been used in traditional Oriental Medicine for treatment of inner ear diseases, such as tinnitus and hearing loss. In the present study, we showed that the ursolic acid obtained from Corni fructus protected HEI-OC1 auditory cells from hydrogen peroxide cytotoxicity in a dose-dependent fashion. In addition, to investigate the protection mechanism of ursolic acid on hydrogen peroxide cytotoxicity toward HEI-OC1, we measured the effects of ursolic acid on lipid peroxidation and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) in hydrogen peroxide treated cells. Ursolic acid (0.05 - 2 µg/ml) had protective effect against the hydrogen peroxide-induced HEI-OC1 cell damage and reduced lipid peroxidation in a dose-dependent manner. Pre-treatment with ursolic acid significantly attenuated the decrease in activities of CAT and GPX, but SOD activity was not affected by the ursolic acid or hydrogen peroxide. These results indicate that ursolic acid protects hydrogen peroxide-induced HEI-OC1 cell damage through inhibition of lipid peroxidation and induce the antioxidant enzymes CAT and GPX.

Key words : ursolic acid, Corni fructus, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, HEI-OC1 cell

서 론

활성산소 (reactive oxygen species: ROS)는 신체 내의 에너지 생성과정, 정상적인 신진대사 과정 및 면역체계를 통해서도 끊임없이 생성되며, 화학적으로 매우 반응성이 높고 불안정하며 세포독성이 있는 물질이다^{1,3}). 이러한 ROS의 축적이 주로 세포내 지질의 과산화, DNA와 단백질의 산화를 일으켜 조직손상과 함께 청력감소와 같은 퇴행성신경질환, 면역결핍증, 동맥경화, 심

장병, 고혈압, 당뇨병, AIDS 그리고 암 등에 있어서 병리적 요인으로 밝혀지고 있다^{1,4}). 과산화수소는 ROS의 중요한 구성요소로서 시험관 (*in vitro*)내에서 산화적 스트레스를 유도하는 물질로 널리 쓰이고 있다⁵). 항산화 시스템에 의한 ROS 방어 기전은 생물체의 생존에 대단히 중요한 역할을 수행한다. ROS의 불활성 및 제거작용은 산화방지 방어 시스템을 구성하는 효소 시스템과 비효소적인 시스템에 의하여 이루어진다. 효소 시스템은 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), 및 glutathione 생성 효소 시스템 등이 알려져 있다^{6,7}). 항산화 효소는 세포막의 지질 과산화 손상, sulfhydryl-함유 효소의 불활성화, 및 구성 단백질의 교차결합 등을 일으키는 ROS

* 교신저자 : 유용욱, 익산시 신용동 원광대학교 치과대학 구강생화학교실

· E-mail : hope7788@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6926

· 접수 : 2006/10/20 · 수정 : 2006/11/21 · 채택 : 2006/12/04

를 불활성화 시키거나 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다⁸⁾.

청각장애는 소음이나 약물 독성에 의한 와우 미토콘드리아 내에서의 과도한 대사가 ROS의 발생을 촉진함으로써 와우 (cochlea) 유모세포의 손상을 증가시킴으로 발생 되는 것으로 보고되고 있다⁹⁻¹²⁾. 또한 자유 라디칼을 소거 또는 형성을 방해하는 항산화제가 청각장애에 효과가 있음^{10,12)}이 밝혀지고 있다.

Ursolic acid는 산수유 (*Corni fructus*)로부터 얻을 수 있는 주요한 triterpenoid 중 하나이다¹³⁾. 산수유나무 (*Cornus officinalis*)는 층층나무과에 속하며, 이른 봄에 노란 꽃이 피어 춘 황금화라고도 하며, 가을에 빨간 열매를 맺기 때문에 가을 산호라는 이름을 갖기도 한다. 산수유는 이러한 산수유나무로부터 수확되는 붉은 색의 열매로 보통 씨를 제거한 후 사용한다¹³⁾. 그리고 민간이나 한약재로 이명, 불감증, 좌골신경통, 야간 발한증, 현기증, 간질환, 신장질환에 사용하고 있다^{13,14)}. 산수유와 관련된 연구를 보면 항균, 항산화 효과^{15,16)}, 항알러지 효과¹⁷⁾, 항암 효과^{18,19)} 항당뇨 효과¹⁶⁾, 산수유 및 차류 식이가 흰쥐의 간기능과 혈액상에 미치는 효과²⁰⁾, 산수유 종자의 독성과 락틴 성분의 항당뇨 효과²¹⁾ 등이 보고되어 있다. 그리고 ursolic acid는 항산화²²⁻²⁴⁾, 항암 효과²⁵⁻²⁷⁾, 면역증진효과²⁸⁾ 등이 보고되었다.

그러나 아직까지 산수유 구성 성분인 ursolic acid의 이명 치료 기전에 대한 연구결과는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 ursolic acid가 청각 세포주 (auditory cell line)인 HEI-OC1 세포에서 과산화수소에 대한 보호 효과가 있음을 알아보고, 과산화수소로 유도된 항산화효소의 활성에 미치는 효과를 검색하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 산수유로부터 ursolic acid 분리

산수유는 전북, 익산, 대화한약국에서 국내산을 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 산수유 2.0 kg을 2 L의 메탄올에 7일 동안 냉침 후 여과지(Watman No. 1)에 거른 후, 감압 농축하여 조추출물 200.0 g을 얻고 이것을 Fig. 1과 같은 방법으로 분획한 결과 ursolic acid 350.0 mg을 얻었다.

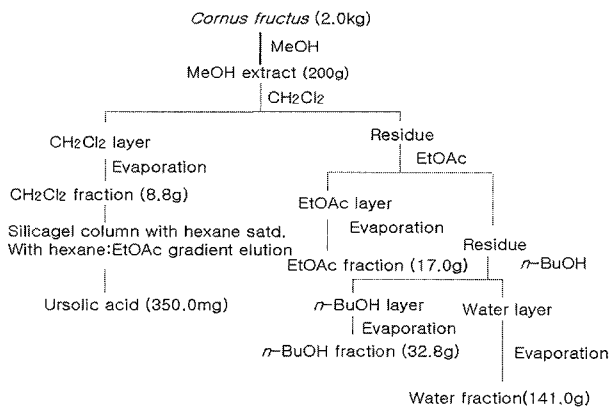


Fig. 1. Extraction procedure of ursolic acid from Corni fructus.

2. 세포 배양

형질변환 쥐 (ImmortomouseTM, Charles River Laboratories, USA)의 와우 (cochlea)로부터 분리 배양한 HEI-OC1 세포는¹²⁾ Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)과 50 U/ml gamma-interferon (INF- γ , R&D System, USA)이 첨가된 배양액으로 배양하였다. 세포 배양기 (5% CO₂, 33°C)의 세포 배양액은 2일 마다 교환해 주었다.

3. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay

Ursolic acid의 HEI-OC1 세포에 대한 세포독성 측정은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA) assay^{29,30)} 이용하여 측정하였다. HEI-OC1 세포는 24-well plate의 각 well당 4×10⁴ 세포를 분주하였다. 세포를 배양기에서 24 시간 동안 안정화 시킨 후, 0.1%의 dimethylsulfoxide (DMSO, Junsei, Japan)에 녹인 ursolic acid (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 μ g/ml)은 실험군에 그리고 0.1% DMSO는 대조군에 첨가하였다. 하루 동안 배양한 세포는 PBS로 용해한 MTT 용액 300 μ l을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. DMSO (200 μ l)를 첨가하여 용해시킨 formazan 결정의 흡광도는 96-well plate로 이동하여, 540 nm 파장의 ELISA analyser (Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)를 이용하여 측정하였으며 세포독성은 대조군에 대한 백분율로 산출하였다. 1mM N-acetyl-cystein (NC)은 양성대조군으로 사용하였다. 또한 과산화수소로 유도된 HEI-OC1 세포 독성 억제 효과를 측정하기 위해 ursolic acid (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 μ g/ml)은 과산화수소 (40 μ M)를 처리하기 1시간 전처리한 후 1일 배양 후, 세포의 생존율은 MTT assay 방법으로 측정하였다.

4. 세포의 지질과산화 측정과 항산화 효소 활성 측정

과산화수소로 유도된 HEI-OC1 세포의 지질과산화와 항산화 효소 활성에 미치는 ursolic acid의 효과를 측정하기 위해 ursolic acid (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 μ g/ml)은 과산화수소 (40 μ M)를 처리하기 1시간 전처리하였다. 1일 후 배양액과 세포를 모아 원심분리 (3000 X g, 6분)하여 상청액을 제거한 후 남은 cell pallet에 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)를 넣고 다시 원심분리 (3000 X g, 6분)한 후 상청액을 제거하였다. 남은 cell pallet에 PBS (pH 7.4)를 1ml 넣어 초음파로 분쇄한 후 원심분리 (4000 X g, 10분)하여 상청액을 -80 °C에 보관하면서 지질과산화 측정과 효소실험을 위한 cell lysates로 사용하였다.

1) 지질과산화 측정

지질과산화는 TBA 방법³¹⁾에 의해 측정하였다. 초음파로 분쇄한 cell lysate 80 μ l에 8.1% sodium dodecyl sulfate 20 μ l를 넣고 10분간 반응시킨 후 20% acetic acid (pH 3.5) 150 μ l, 0.8% TBA (in 0.05 N NaOH) 150 μ l를 부가하여 잘 혼합한 후 1시간 동안 가열하였다. n-buthanol-pyridine (1:3)을 1ml를 첨가한 후에 15000 × g에서 5분간 원심분리하여 상층액의 흡광도는 532 nm 파장에서 측정하였다. 지질과산화 생성물은 thiobarbituric

acid reactive substance (TBARS)로 측정하였으며, malonedialdehyde nmole/mg protein으로 표시하였으며 1mM NC은 양성대조군으로 사용하였다.

2) Superoxide dismutase (SOD)와

SOD의 활성도는 SOD assay Kit (Dojindo Molecular Technologies Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다³²⁾. 흡광도는 microplate reader (Spectra Max 250, Molecular Devices Co.)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 효소의 활성도는 bovine erythrocyte SOD (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.)의 표준 검량곡선에 준하여 계산한 후 단백질 1mg 당 Unit로 표시하였다 (Unit/mg protein)

3) Catalase (CAT) 활성도 측정

CAT의 활성도는 Carrillo 등³³⁾의 방법을 적용하였다. 50 mM의 PBS (pH 7.0)에 3% H₂O₂ 12 µl과 cell lysates 100 µl을 가하여 최종적으로 1.0 ml가 되도록 하여 37 °C에서 2분간 처리한 후 240 nm에서 5분간 흡광도 변화를 측정한 후 1분 동안 소거된 H₂O₂ µmole을 1 Unit로 하여 단백질 1 mg 당 Unit로 표시하였다 (Unit/mg protein).

4) Glutathione peroxidase (GPX)

GPX의 활성도는 Flohe와 Gunzler³⁴⁾의 방법에 의하여 측정하였다. Cell lysates 10 µl에 100 mM PBS (pH 7.2) 200 µl과 2.4 U/ml GR, 10 mM GSH, 3 mM NADPH를 각각 10 µl씩 첨가하였다. 최종적으로 12 mM cumene hydroperoxide를 10 µl 첨가하여 반응을 개시한 후 37 °C에서 5분 동안 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 GPX 활성도는 단백질 1 mg 당 1분 동안 소비된 NADPH nmole을 1 mUnit로 표시하였다 (mUnit/mg protein)

5) 단백질 함량 측정

Lowry 등³⁵⁾의 방법에 의하여 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co.)을 표준용액으로 사용하여 측정하였다.

5. 통계분석

실험은 모두 3회 반복하였으며, 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS (ver 10.0)를 사용하여, 평균과 표준오차로 제시하였으며, α=0.05 수준에서 실험군과 대조군의 평균치에 대하여 Student's t-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. Ursolic acid의 HEI-OC1 세포에 대한 세포독성

Ursolic acid의 HEI-OC1 세포에 대하여 직접적인 독성작용은 MTT 방법으로 조사하였다. 다양한 농도의 ursolic acid 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 µg/ml을 24 시간 동안 처리한 결과 2 µg/ml 이하농도에서는 세포 생존율에 유의한 차이를 관찰할 수 없었으나, 5 µg/ml 농도의 ursolic acid는 유의한 세포독성을 나타냈다. 이 결과를 근간으로 ursolic acid의 HEI-OC1 세포 보호효과 및 지질과산화, 항산화 효소 실험은 2 µg/ml 이하의 농도에서 수행하였다 (Fig. 2).

2. Ursolic acid의 과산화수소 세포독성 억제 효과

과산화수소로 처리한 세포독성에 대한 ursolic acid의 보호효과를 조사하기 위하여, 과산화수소 (40 µM)을 처리 1시간 전 다양한 농도의 ursolic acid (0.05-2 µg/ml)을 HEI-OC1 세포에 처리한 후 세포 생존율을 조사하였다. Fig. 3과 같이 과산화수소 단독 처리군의 세포 생존율은 대조군에 비교하여 55%로 감소한 반면, ursolic acid 처리군은 처리농도 0.05 µg/ml 이상에서부터 농도 의존적인 세포 생존율 증가를 관찰할 수 있었다 (p<0.05). 특히, 2 µg/ml 처리군에서는 77%의 높은 생존율을 보였으며, 양성 대조군인 NC (1 mM) 처리군에 비교하여 높은 생존율을 나타냈다.

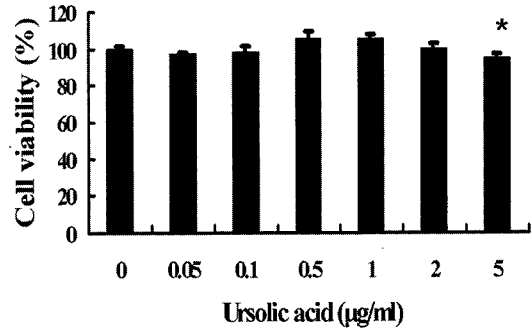


Fig. 2. Cytotoxicity of ursolic acid on HEI-OC1. Cells were pretreated with various concentrations of ursolic acid for 1 day and cell viability was determined by the MTT assay. Data are mean ± S.E. in triplicate. *p<0.05 when compared with control group.

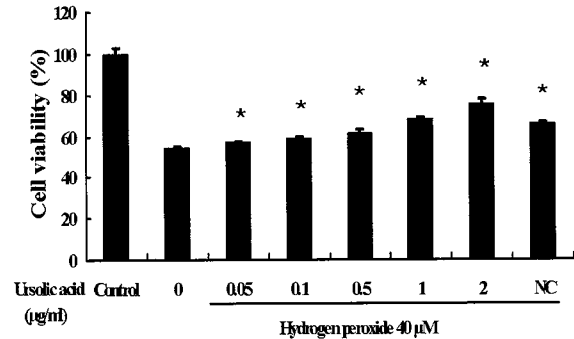


Fig. 3. Protective effect of ursolic acid on hydrogen peroxide-induced cell damage. Pretreatment of ursolic acid resulted in increase of HEI-OC1 viability after hydrogen peroxide addition. Cells were preincubated with the indicated doses of ursolic acid for 1 h prior to the addition of hydrogen peroxide and further maintained for 1 day. Data are mean ± S.E. in triplicate. *p<0.05 when compared with hydrogen peroxide-treated group without ursolic acid pretreatment. NC, 1 mM of N-acetyl cysteine.

3. Ursolic acid의 지질과산화 억제 효과

과산화수소에 의한 HEI-OC1 세포의 지질과산화에 대한 ursolic acid의 효과를 조사하기 위하여 과산화수소 (40 µM) 처리 1시간 전 ursolic acid (0.05-2 µg/ml)을 처리한 후 지질과산화량을 측정하였다 (Fig. 4). Ursolic acid 처리는 0.05 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 과산화수소에 의한 지질과산화를 억제하였다 (p<0.05). 또한 ursolic acid 2 µg/ml 처리군은 NC (1 mM) 처리군과 비슷하게 지질과산화를 감소시켰다.

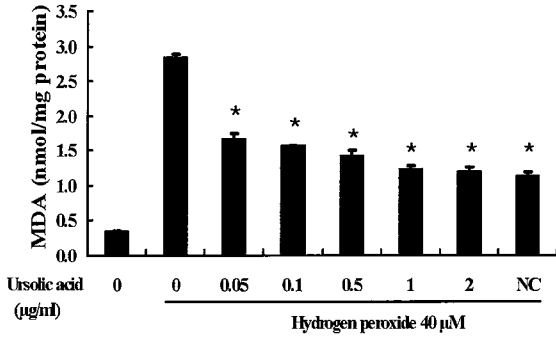


Fig. 4. Inhibitory effect of ursolic acid on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation of HEI-OC1. Cells were preincubated with various doses of ursolic acid for 1 h prior to the addition of hydrogen peroxide and further maintained for 1 day. Data are mean ± S.E. in triplicate. *p<0.05 when compared with hydrogen peroxide-treated group without ursolic acid pretreatment. NC, 1 mM of N-acetyl cysteine.

4. SOD, CAT, GPX 활성도

Table 1은 ursolic acid (0.05-2 µg/ml)이 과산화수소로 유도된 HEI-OC1 세포의 SOD, CAT, GPX의 활성도에 미치는 영향을 나타내었다. SOD 활성도는 과산화수소만을 처리한 군이나 ursolic acid (0.05-2 µg/ml)을 같이 처리한 군 모두 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 CAT와 GPX 활성도는 과산화수소만을 처리한 군은 대조군에 비해 낮아졌다가 ursolic acid (0.05-2 µg/ml)처리군은 증가하였다 (p<0.05). 특히 CAT 활성도는 ursolic acid (0.05-2 µg/ml) 처리 농도증가에 따라 의존적으로 증가하였는데 ursolic acid 0.05 µg/ml 이상으로 처리한 군은 대조군보다 높은 활성도를 나타내었다. GPX 활성도는 ursolic acid 0.05-2 µg/ml을 동시에 처리한 군에서 과산화수소만을 처리한 군에 비하여 GPX 활성도가 유의적으로 증가하였으며 (p<0.05), 1 µg/ml을 처리한 군이 가장 높은 활성도를 나타내었다.

Table 1. Effect of ursolic acid on SOD, CAT and GPX activities in HEI-OC1 cells.

| Sample concentration (µg/ml) | Hydrogen peroxide (40 µM) | SOD (Unit/mg protein) | CAT (Unit/mg protein) | GPX (mUnit/mg protein) |
|------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| Control | - | 5.50±0.22 | 29.36±1.45 | 61.94±3.12 |
| 0 | + | 5.14±0.57 | 23.53±0.53 | 38.43±0.77 |
| 0.05 | + | 5.08±0.03 | 24.59±1.08 | 47.37±3.29* |
| 0.1 | + | 5.20±0.13 | 27.32±1.03* | 53.55±4.78* |
| 0.5 | + | 5.17±0.15 | 34.32±0.46* | 60.86±5.42* |
| 1 | + | 5.79±0.05 | 38.31±0.47* | 62.90±6.13* |
| 2 | + | 6.06±0.15 | 39.32±0.82* | 54.55±3.20* |

고찰

산수유 (Cornus officinalis)는 보익간신 (補益肝腎), 삼정축뇨 (澀精縮尿의), 고경지혈 (固經止血) 효능이 있어 청력을 좋게 하며 이명이농(耳鳴耳聾)이 있을 때 쓰인다^{13,36}고 기록되어 있다. 이에 산수유의 열매 (Corni fructus)로부터 ursolic acid를 분리하여 청각세포주인 HEI-OC1에 미치는 영향을 알아본 결과, 과산화수소에 의한 HEI-OC1 세포독성에 대한 ursolic acid의 보호효

과를 관찰할 수 있었다. HEI-OC1 세포에서 40 µM 과산화수소의 세포독성은 대조군의 55% 수준으로 생존율을 감소하였으나, ursolic acid는 농도 의존적으로 과산화수소 세포독성을 억제하여 2 µg/ml 농도 처리군의 생존율은 77%까지 증가하였다. 이것은 양성 대조군인 NC (1 mM) 처리군보다 높은 생존율이었다.

다음엔 ursolic acid가 과산화수소를 처리한 세포의 지질 과산화에 미치는 영향을 조사하였다. 선행 연구에 의하면 과산화수소로 유도된 이독성이 ROS에 의해 유도된 세포막의 지질 과산화와 관련이 있다¹¹고 한다. HEI-OC1 세포에서 과산화수소는 대조군에 비교하여 6배 정도 증가된 지질과산화를 유도하였으나, ursolic acid의 전처리에 의하여 농도 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 ursolic acid의 지질과산화 억제 효과는 과산화수소에 의한 세포독성을 방어하는 주된 작용기전의 하나로 추정된다.

Ursolic acid가 과산화수소의 세포독성에 대한 또 다른 보호기전을 알아보기 위해, ursolic acid가 과산화수소로 처리한 HEI-OC1세포의 SOD, CAT, GPX 활성에 미치는 영향을 조사해 보았다. 과산화수소를 처리한 HEI-OC1 세포에 ursolic acid를 넣어도 SOD 활성은 변하지 않은 반면 CAT와 GPX 활성은 유의적으로 증가하였다. 이는 SOD, CAT, GPX의 작용기전의 차이로 보이며, SOD는 세포내 호흡작용의 부산물로서 생성되는 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는 효소^{37,38}이므로 과산화수소에 의한 산화적 스트레스에 대한 반응이 미흡한 것이 원인으로 생각된다. 반면, CAT와 GPX는 둘 다 과산화수소를 제거하는 효소이기 때문일 것으로 생각된다. 즉, CAT는 과산화수소를 산소와 물로 전환하는 효소이며, GPX는 peroxidase 일종으로 과산화수소를 소거하면서 과산화수소와 환원형 glutathione (GSH)과 반응하여 산화형 glutathione (GSSG)을 생성하고 이 GSSG는 GR의 도움으로 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원시킨다^{34,38,39}. 또한 GPX는 microsome에서 생성된 과산화수소 등의 과산화물 해독 기능에 CAT보다 더 효과적으로 작용하는 것으로 알려져 있는데³⁹, ursolic acid는 저농도 (0.05 µg/ml)에서도 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내어 과산화수소 등의 과산화물 해독 기능에 더욱 효과적일 것으로 생각된다.

Shih²³는 ursolic acid가 쥐의 hippocampus에서 kainate 유도 독성을 감소시켰는데, 이것은 ursolic acid가 자유 라디칼 형성을 감소시킴과 자유 라디칼을 제거 하는 기전을 통해서라고 보고하였다. Balanehru 와 Nagarajan²³는 ursolic acid가 지질과산화를 막아 간독성을 낮추어준다고 보고하였다. 그리고 Martin-Aragon²⁴은 ursolic acid가 carbon tetrachloride로 유도된 간 손상과 염증을 막아주며, 간의 항산화 수치를 증가시킨다고 보고하여 ursolic acid가 내이가 아닌 다른 기관에도 항산화 효과가 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과에서 보는 바와 같이 ursolic acid는 HEI-OC1 세포 내에서의 항산화효소를 활성화 시켜 과산화수소의 산화적 손상으로부터 세포 보호 효과를 나타내게 할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 ursolic acid 2 µg/ml 처리군은 CAT 활성도가 가장 높게 나타났으며, 1 µg/ml 처리군은 GPX 활성도를 현저하게 증

가시켜 항산화효과를 보였다.

앞으로 ursolic acid의 세포내 항산화효소 활성 기전을 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이며, 본 연구의 결과로 보아 ursolic acid의 청각세포주인 HEI-OC1 세포의 산화적 손상을 억제하기 위한 이용 가능성을 전망해 볼 수 있다.

결 론

산수유로부터 추출한 ursolic acid가 청각세포주인 HEI-OC1 세포의 산화적 손상 억제에 미치는 효과를 조사하기 위하여 ursolic acid (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 µg/ml)을 처리한 후 40 µM 과산화수소를 처리한 결과 ursolic acid은 과산화수소에 의한 HEI-OC1 세포의 세포독성을 유의하게 억제하는 효과를 나타냈었으며 (p<0.05), 과산화수소에 의한 세포의 지질과산화를 억제하였다 (p<0.05) 또한 ursolic acid가 과산화수소를 처리한 HEI-OC1 세포의 SOD, CAT, GPX 의 활성도에 미치는 영향을 알아본 결과 SOD 활성도는 차이가 없었지만 CAT 활성도는 0.1, 0.5, 1, 2 µg/ml 농도로 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의적으로 높았으며 (p<0.05), GPX 활성도는 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 µg/ml 농도 처리군 모두 대조군에 비하여 유의적으로 높았다 (p<0.05). 이상의 결과, ursolic acid은 HEI-OC1 세포 내에서 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로 인해 ROS의 발생을 억제시켜 산화적 손상에 대한 방어효과가 있는 것으로 생각되며, 임상에서 적용하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Sies, H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 91(3C):31S-38S, 1991.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine, 3rd end, Oxford University Press, New York, 1998.
- Matthew, B., Gri, S. Reactive oxygen species in immune responses. *Free Radic Biol Med* 36(12):1479-1480, 2004.
- Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., Valente, L., Bragantini, F., Leger, B., Dabbeni-Sala, F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J Biochem* 271(18):3646-3656, 2004.
- Satoh, T., Sakai, N., Enokido, Y., Uchiyama, Y., Hatanaka, H. Free radical independent protection by nerve growth factor and Bcl-2 of PC12 cells from hydrogen peroxide-triggered apoptosis, *J Biochem* 120(3):540-546, 1996.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Bio Med* 17:235-248, 1994.
- Krinsky, M. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:248-234, 1992.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
- Lopez-Gonzalez, M.A., Guerrero, J.M., Rojas, F., Delgado, F. Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res* 28(2):73-80, 2000.
- Ford, M.S., Nie, Z., Whitworth, C., Rybak, L.P., Ramkumar, V. Up-regulation of adenosine receptor in the cochlea by cisplatin. *Hear Res* 111(1-2):143-152, 1997.
- Ravi, R., Somani, S.M., Rybak, L.P. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* 76(6):386-394, 1995.
- Kalinec, G.M., Webster, P., Lim, D.J., Kalinec, F. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol Neurootol* 8(4):177-189, 2003.
- 한국생약학교수협의회. 본초학. 아카데미서적, 서울, pp 865-867, 2004.
- 한명주, 홍주영, 류중훈, 김대병. 먹으면 약이 되는 100가지 허브. 효일, 서울, pp 100-101, 2004.
- 서권일, 이상원, 양기호. 산수유 추출물의 항균 및 항산화성. *한국식품저장유통학회지* 6(1):99-103, 1999.
- 김옥경. 산수유 추출물이 Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 항당뇨 및 항산화 작용에 미치는 효과. *한국유화학회지* 22(2):157-167, 2005.
- 서영배, 길기정, 이용구, 이영철. 산수유의 항알러지 효과에 관한 연구. *대한본초학회지* 17(1):1-12, 2002.
- 김병현, 박경욱, 김재용, 정일윤, 양기호, 조영숙, 이성태, 서권일. 산수유에 함유된 항암물질의 정제 및 특성. *한국식품과학회지* 36(6):1001-1007, 2004.
- 최원형, 천현자, 백승화, 우원홍. 산수유 클로로포름 추출물에 의한 B16/F10 melanoma세포의 증식억제효과. *응용약물학회지* 11:151-156, 2003.
- 주현규, 장대자. 산수유 및 차류식이 흰쥐의 간기능과 혈액상에 미치는 영향. *한국식생활문화학회지* 4(3):257-264, 1989.
- 정시련, 전경희, 박소영, 장순자. 산수유 종자의 독성과 펙틴 성분. *생약학회지* 24(2):177-182, 1993.
- Shih, Y.H., Chein, Y.C., Wang, J.Y., Fu, Y.S. Ursolic acid protects hippocampal neurons against kainate-induced excitotoxicity in rats. *Neurosci Lett* 362(2):136-140, 2004.
- Balanehru, S., Nagarajan, B. Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. *Biochem*

- Int 24:981-990, 1991.
24. Martin-Aragon, B., de las Heras, M.I., Sanchez-Reus, Benedi, J. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Toxicol Pathol* 53(2-3):199-206, 2001.
 25. 이정규, 박수완, 정해영, 서석수, 양한석, 박건영. 비파엽의 Ursolic Acid 성분의 항암작용기전. *대한암학회지* 23(2):206-210, 1991.
 26. 하재정, 류태형, 최은상, 정해영, 박건영. 자연 발암성의 생쥐 간암에 대한 Ursolic Acid 의 항암효과. *대한암학회지* 24(6):790-794, 1992.
 27. 이근호, 임은경, 윤주희, 엄수종, 남궁성은, 박종섭. Ursolic acid에 의한 자궁 경부암 세포주에서 항증식, 항바이러스 작용 기전 분석. *대한부인종양·콜포스큐피학회지* 4(4):306-314, 2003.
 28. 김광혁, 장명웅, 김은영, 박건영. Ursolic acid와 Linoleic acid 가 Sarcoma 180 마우스의 T-subset에 미치는 효과. *J Bacteriol Virol* 28(3):239-249, 1993.
 29. Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119(2):203-210, 1989.
 30. Watson, J.M., Parrish, E.A., Rinehart, C.A. Selective potentiation of gynecologic cancer cell growth in vitro by electromagnetic fields. *Gynecol Oncol* 71:64-71, 1998.
 31. Teranishi, M., Nakashima, T., Wakabayashi, T. Effects of alpha-tocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hear Res* 151(1-2):61-70, 2001.
 32. Tan, A.S., Berridge, M.V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J Immunol Methods* 238(1-2):59-68, 2000.
 33. Carrillo, M.C., Kanai, S., Nokubo, M., Kitani, K., Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci* 48:517-521, 1991.
 34. Flohe, L., Glunzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114-121, 1984.
 35. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275, 1951.
 36. 육창수 외. *한국본초학*, 계축문화사, 서울, p 225, 1993.
 37. Fridovich, I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 264: 7761-7764, 1989.
 38. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Bio Med* 17:235-248, 1994.
 39. Meister, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269(13):9337-9400, 1994.