大韓獸醫學會誌(2007) 第47卷 第1號
Korean J Vet Res(2007) 47(1) : 25~32

비 지질 산화손상에 대한 어성초 뿌리의 항산화 효과

하대식[1] · 김충희[2] · 김의경 · 강정부 · 김종수*

경상대학교 수의과대학 (동물의학연구소), [1]경상남도 축산진흥연구소 중부 지소,
[2]진주산업대학교 동물생명과학과

(게재승인: 2007년 3월 15일)

Antioxidative effects of *Houttuynia cordata* root on non-lipid oxidative damage

Dae-Sik Hah[1], Chung-Hui Kim[2], Euikyung Kim, Chung-boo Kang, Jong-shu Kim*

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Institute of Animal Science), Jinju 660-701, Korea
[1]Gyeongnam Livestock Promotion Institute Middle-branch, Changwon 541-703, Korea
[2]Department of Animal Science and Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

(Accepted: March 15, 2007)

Abstract : This study was designed to evaluate the antioxidative effects of *Houttuynia cordata* root on non-lipid oxidative damage. The antioxidative effects of methanolic (MeOH) extract of *Houttuynia cordata* root on non-lipid, including liposome oxidation, oxidation of deoxyribose, protein oxidation, chelating, scavenging, and 2'-deoxyguanosine (2'dG) oxidation were investigated. *Houttuynia cordata* root exhibited high antioxidative effect in a liposome model system. The inhibitory effect of MeOH extract on deoxyribose damage exhibited antioxidative effect and it afforded considerable protection against damage to deoxyribose. In addition, MeOH extract at over 300 μg was effective (> 80%) in protecting protein oxidation. The MeOH extracts exhibited metal binding ability for hydrogen peroxide. Furthermore, the oxidation of 2'dG to 8-hydroxy-2-deoxyguanosine was inhibited by MeOH extracts, and scavenging activity for hydroxyl radical exhibited a remarkable effect. The present results on biological model systems showed that MeOH extracts was effective in the protection of non-lipids against various oxidative model systems.

Key words : antioxidative effect, *Houttuynia cordata root*, non-lipid, oxidative damage

서 론

Houttuynia cordata(어성초)는 Saururaceae과 식물로써 주성분은 quercitrin, sterol, phenol 등이며 약효로는 지혈, 이뇨, 활혈, 이습, 소종, 영심, 해독, 타박상, 출혈, 혈변, 심계, 부종 치료에 주로 쓰인다 [4].

포유류 동물은 산소를 이용하여 에너지 대사를 하여 생존 한다. 그러나 생체 내로 들어온 산소는 여러 가지 물리적, 화학적, 생물학적 스트레스를 받으면 superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl(OH) radical 등의 유해활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)으로 변하여 생체에 유해한 작용을 나타내는데 이 ROS는 생체 세포내의 정상 대사의 부산물로서 끊임없이 생성된다 [7, 18, 21]. 생체 세포막내에서는 강력하고 다양한 free radical을 생산하는데 세포막 지질 성분인 arachidonic acid가 cyclooxygenase에 의하여 prostaglandins을 산출하게 되고 lipoxygenase에 의하여 leukotrienes이 생산되는 과정에서 OH radicals과 같은 중간대사물질이 생성되게 된다. Arachidonic acid 연속반응이 free radical을 생산할 뿐만 아니라 arachidonic acid 그 자체가 다른 원인에 의

*Corresponding author: Jong-Shu Kim
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University (Institute of Animal Science), Jinju 660-701, Korea
[Tel: +82-55-751-5821, Fax: +82-55-751-5803 E-mail: jskim@gnu.ac.kr]

해서도 강력한 free radical을 생산하게 된다 [8, 11, 18, 28]. 가장 반응성이 강하고 독성이 강한 OH radical은 반응 과정 중 중금속 이온을 필요로 하는 두 가지 화학반응 즉 Haber-Weiss 반응과 Fenton reduction에 의해서 강력한 free radical 이 생성되는데 이중 정상 생리적인 조건 하에서는 Fenton reduction에 의하여 OH radical이 많이 생성되는 것으로 알려져 있다 [1, 8, 15, 18, 28]. 이와 같이 정상적인 생체 대사조건 하에서나 물리적, 화학적, 생물학적 스트레스를 받게 되어 생산되는 free radical은 생체 내 자기 방어 기전 즉 superoxide dismutase, hydrogen peroxidase, catalase등과 같은 항산화 효소에 의하여 제거되나, 생체방어 기전을 초과하는 free radical이 생성되면 이들은 세포막을 공격하여 지질 과산화를 일으키고 나아가 liposome, deoxyribose, protein, 2'-deoxyguanosine(2'-dG)등을 공격하여 산화를 유발시켜 여러 가지 성인질병 즉 만성염증, 류마티스 관절염, 동맥경화증, 암과 노화의 원인이 된다고 알려져 있다 [5, 12, 17, 19, 22, 24, 27]. 따라서 식품의 산화방지 뿐만 아니라 각종질병의 예방차원에서 항산화제에 대한 많은 연구가 최근에 진행되고 있다. 현재 합성 항산화제로는 butylated hydroxyanisole(BHA)과 butylated hydroxytoluene(BHT)가 있으나 이들은 발암성이 있다고 보고 된 후 사용이 제한되고 보다 안전한 항산화제 개발을 위하여 한방약초의 천연성분에서 항산화제를 개발하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다 [2,10]. 그러나 지질과 산화를 예방할 수 있는 많은 항산화제들은 일부 탄수화물, DNA, 단백질 등에 상해를 가할 수 있는 강력한 세포독성 물질로 작용 할 수 있는 부산물을 산출하기도 한다 [5, 8, 20, 23]. 본 실험에서 사용한 *Houttuynia cordata* root(어성초 뿌리) 메탄올 추출액이 non-lipids에 대하여 산화적 손상을 유발할지 또는 산화적 손상을 예방 할 수 있는 가능성의 여부는 연구된 바가 없다. 본 연구의 목적은 비지질성 산화적 손상에 대한 어성초 뿌리 메탄올 추출액의 항산화 효과를 조사하는 것이다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구의 실험재료로 사용한 어성초 뿌리는 경남 약초 재배 연구소에서 구입하여 수세한 다음 음건하고 세절하여 사용하였다.

시료의 추출

시료의 추출은 수직으로 환류 냉각관을 부착시킨 2구 환저플라스크에 음건 세절한 약초 300 g에 메탄올 900 ml을 가하여 수욕 상에서 3시간 동안 환류 냉각하면서 3회 반복 추출하여 얻어진 용액을 합하고 여과한 후 회전 진공증발 농축기로 농축하여 MeOH 엑스를 얻어 이를 비 지질 산화적 손상 예방 효과 측정에 사용하였다.

Liposome 산화에 대한 항산화 효과 측정

Lecithin(ICN, USA) 580 mg을 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) 58 ml이 들어 있는 ultrasonic cleaner(Branson B-221 Smithkline company, USA)에서 2시간 동안 초음파 처리하였다. 초음파 처리된 용액(10 mg lecithin/ml), $FeCl_3$, ascorbic acid와 각 약초 MeOH 추출액(50~1,200 μg)을 혼합하여 최종 농도가 3.12 mg lecithin/ml, 125 μM $FeCl_3$, 125 μM ascorbic acid가 되게 조제하였다. 이 혼합 용액을 thiobarbituric acid(TBA)방법으로 [25] 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 lecithin을 제외한 다른 시약들이 들어간 sample을 blank로 하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Deoxyribose의 산화에 대한 항산화 효과 측정

Deoxyribose damage에 대한 항산화 효과 측정은 Halliwell 등 [9]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 약초 MeOH 추출액(50~1,200 μg), deoxyribose(6 mM), hydrogen peroxide(3 mM), KH_2PO_4-K_2HPO_4 buffer(20 mM, pH 7.4), $FeCl_3$(400 μM), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA; 400 μM)과 ascorbic acid(400 μM) 혼합액(전체 3.5 ml)을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 1% TBA 1 ml과 2.8% trichloroacetic acid(TCA) 1 ml을 첨가하고 90°C water-bath에서 20분간 배양하였다. 배양 후 sample을 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 모든 sample은 3회 반복하여 평균값으로 하였다.

Protein carbonyl 형성에 대한 항산화 효과 측정

Protein carbonyl 형성에 대한 항산화 효과 측정은 Lenz 등 [16]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 약초 MeOH 추출액(50~1,200 μg), phosphate buffer(20 mM KH_2PO_4-K_2HPO_4, pH 7.4), bovine serum albumin(20 mg/ml), $FeCl_3$(100 μM), hydrogen peroxide(2 mM), ascorbic acid (200 μM) 혼합액(전체 1.2 ml)을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 20 mM HCl 1 ml과 cold TCA(20%, w/v) 1 ml을 첨가하여 3,000 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 침전된 단백질을 2 ml ethanol-ethyacetate(1 : 1)로 세 번 세척한 후 6 M guanidine-HCl 2 ml로서 녹인 다음 370 nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다.

2'-dG 산화 억제효과

2'-dG oxidation에 대한 효과 측정은 Wilson 등 [28]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 메탄올 추출액(50~1,200 μg),

2'-dG(0.5 mM), KH_2PO_4-K_2HPO_4 buffer(0.1 M, pH 7.4), 혼합액(총 1.4 ml)에 hydrogen peroxide(50 mM), $FeCl_3$ $6H_2O$(1.3 mM), EDTA(6.5 mM), ascorbic acid(15 mM)을 첨가함으로서 Fento reaction을 유도한 다음 37°C에서 30분간 배양하고 ice-bath에서 반응을 중지 시켰다. 0.45 μm로 여과한 후 HPLC(Water, USA)로 분석하였다. 분석에 이용된 칼럼은 Water E2241F(103 mm × 1 mm, 0.5 μm)과 UV detector(254 nm)를 사용하였고 이동상 용매는 50 mM KH_2PO_4(pH 4.61)-methanol(92 : 8 v/v), 유속은 0.5 ml/min로 컬럼을 평행 시킨 후 표준 2'-dG 와 8-hydroxy-2-deoxyguanosine(8-OH-2'dG)을 주입하여 retention time과 peak areas 값으로 분석 비교하였다.

OH radical 소거 효과

OH radical 소거 효과는 Shi 등 [21]의 방법에 따라 100 μM vitamin C, 100 μM $CuSO_4$, 12 μM cytochrome C가 함유된 sodium phosphate buffer(0.15 mM, KH_2PO_4-K_2HPO_4, pH 7.4) 3 ml로 OH radical을 유도하고 여기에 각 시료를 농도별로 첨가하여 25°C에서 90분간 반응 시킨 후 550 nm에서 cytochrome C의 색깔 변화의 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료대신 thiourea를 사용하였고 이때 thiourea에 의해 유도된 OH radical의 억제율(%)을 100%로 하였으며, 억제율(%)은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate}(\%) = \frac{T - T2}{T - T1} \times 100\ \%$$

T : The transmittance of OH radical generation system,
T1 : Transmittance of control system
T2 : Transmittance of test sample system

Metal ions에 대한 chelating activity 측정

Fe_2^+에 대한 약초 메탄올 추출액의 chelating activity 측정은 Carter [3]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 0.2 ml (50~1,200 μg) 추출액과 2.0 mM $FeCl_2$ $4H_2O$ 0.05 ml을 배양한 후 5.0 mM ferrozine 0.2 ml을 첨가하여 반응을 유도한 다음 0.8 ml methanol을 첨가하여 10분 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며 이때 양성 대조군으로서는 EDTA를 사용하였고, 음성 대조군으로서는 추출액을 첨가하지 않은 sample을 이용하였다.

Hydrogen peroxides scavenging 효과 측정

Hydrogen peroxides scavenging 효과 측정은 Ruch 등 [21]의 방법에 따라 측정하였다. 20°C phosphate buffer saline(pH 7.4)으로 2 mM hydrogen peroxides를 만들고 추출액을 cartridge(Sep-Pak C18; Waters Associates, USA)으로 탈색한 다음 이 추출액을 0.6 ml hydrogen peroxides에 첨가하여 10분 후 230 nm에서 sample의 흡광도를 측정하였다. 이때 blank는 hydrogen peroxides를 제외시키고 추출액이 포함된 PBS를 사용하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 Statistical Analysis System(SAS)를 이용하여 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 처리군 사이의 유의수준 $p < 0.05$로 Dunnett's *t*-test를 이용하여 실시하였다.

결 과

Liposome oxidation에 대한 항산화 효과

인지질은 phosphatidylcholine(lecithin)와 같은 phosphatidic acid의 유도체로써 세포막 구성성분으로서 세포막에 많이 함유되어 있는 세포막의 주요 구성성분이다. 인지질인 liposome(lecithin)을 이용하여 어성초 뿌리 메탄올 추출물을 농도별로 첨가하여 liposome peroxidation 억제 능력을 측정한 결과, 100 μg에서는 28.94%, 300 μg에서는 31.25%, 600 μg 농도에서 32.13%, 1,200 μg에서는 30.88%로 나타나 약초 추출물이 600 μg까지는 농도의존형으로 liposome peroxidation 억제능력이 증가하는 경향이나 1,200 μg에서는 오히려 억제력이 다소 감소하는 경향을 보여 앞으로 연구나 실제 임상에 사용 시 농도는 600 μg 이하의 농도를 사용하여야 최대의 효과를 얻을 것 같다.

이와 같은 어성초 뿌리의 liposome peroxidation에서 얻은 최대 억제 능력 32.13%는 현재 합성 항산화제로 이용되고 있는 BHA, BHT와 천연 항산화제인 tocopherol의 liposome peroxidation 억제능력과 어떠한 관계가 있는지 비교하기 위하여 BHA, BHT, 천연 항산화제인 tocopherol의 liposome peroxidation 억제능력을 측정한 결과 BHT는 첨가 농도에 관계없이 어성초보다 liposome peroxidation 억제능력이 높게 나타났으며($p < 0.01$), BHA는 100 μg 첨가시를 제외하고는 어성초보다 liposome peroxidation 억제능력이 낮게 나타났고($p < 0.05$), TCP는 1,200 μg을 제외하고는 모든 농도에서 어성초 보다 liposome peroxidation 억제 능력이 낮게 나타났다($p < 0.05$) (Fig. 1).

Deoxyribose 산화적 손상에 대한 어성초 뿌리 메탄올 추출물의 항산화효과

Fe^{3+}/H_2O_2 로 유도한 deoxyribose damage에 대한 농도

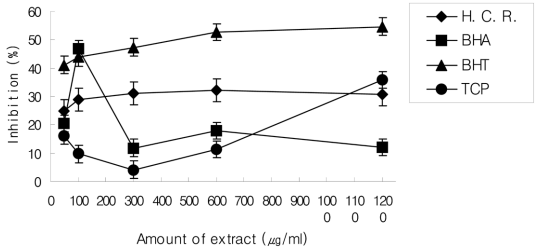

Fig. 1. Antioxidative effect of methanolic extract at different concentrations of the *Houttuynia cordata* root on liposome model system. HCR; *Houttuynia cordata* root, BHA; Butylated hydroxyanisol, BHT; Butylated hydroxytoluene, TCP; Tocopherol.

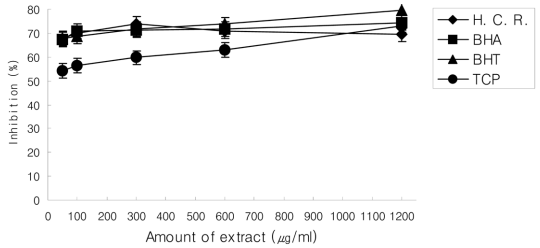

Fig. 2. Antioxidative effect of methanolic extract at different concentrations of the *Houttuynia cordata* root on deoxyribose oxidative damage. HCR; *Houttuynia cordata* root, BHA; Butylated hydroxyanisol, BHT; Butylated hydroxytoluene, TCP; Tocopherol.

별 어성초 뿌리 추출물의 항산화 능력을 TBA 법으로 측정한 결과 100 μg 농도에서는 69.97%, 300 μg 농도에서는 73.99%, 600 μg 농도에서는 73.74%, 1,200 μg에서는 69.63%로 나타났다. Deoxyribose damage 억제에 대한 어성초 뿌리의 최대 억제효과는 300 첨가 시 73.99%로 나타났는데 이 억제 효력과 현재 합성 항산화제로 이용되고 있는 BHA, BHT 와 천연 항산화제인 tocopherol과의 deoxyribose damage 억제능을 비교한 결과 합성 항산화제 BHA는 모든 농도에서 70% 이상(최대 74.45%)의 deoxyribose damage 억제능을 보여 어성초 보다 억제능이 뛰어 났으며, BHT 또한 BHA와 비슷한 억제능을 보여(최대 79.72%) 어성초 보다 뛰어 났다. 그러나 TCP는 1,200 μg 첨가시를 제외하고는 모든 농도에서 어성초 뿌리보다 낮게 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 2).

단백질 산화적 손상에 대한 어성초 뿌리 메탄올 추출물의 저해효과

$FeCl_3$, H_2O_2와 ascorbic acid로 유도한 protein carbonyl 형성에 대한 농도별 어성초 뿌리 추출물의 항산화 효과

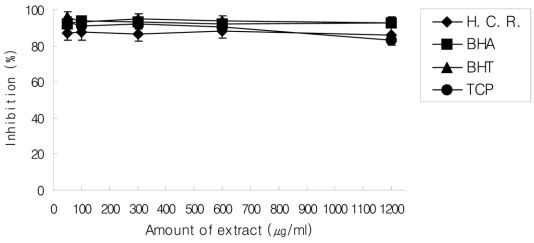

Fig. 3. Antioxidative effect of methanolic extract at different concentrations of the *Houttuynia cordata* root on protein oxidative damage. HCR; *Houttuynia cordata* root, BHA; Butylated hydroxyanisol, BHT; Butylated hydroxytoluene, TCP; Tocopherol.

를 측정한 결과 100 μg 농도에서 87.36, 300 μg에서는 86.44%, 600 μg 농도에서는 88.29%, 1,200 μg에서는 85.85%로 나타났다. 현재 합성 항산화제로 이용되고 있는 BHA, BHT와 천연 항산화제인 tocopherol과의 protein carbonyl 형성에 대한 억제능을 비교한 결과 합성 항산화제 BHA는 92.92~94.75%로, BHT는 92.21~94.75%로 나타났으며 천연 항산화제 tocopherol도 83.36~92.35%로 어성초 뿌리보다 단백질의 산화적 손상 억제력이 뛰어났으나 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 3).

철이온에 대한 어성초 뿌리 메탄올 추출물의 킬레이트 효과

철이온에 대한 농도별 어성초 뿌리 추출물의 킬레이트 효과는 100 μg 농도에서는 15.32%, 300 μg 농도에서는 23.29%, 600 μg 농도에서는 31.02%, 1,200 μg 농도에서는 30.06%로서 300 μg 이상의 농도에서 킬레이트 효과가 높게 나타났다. 킬레이트를 유도하는 EDTA와의 효과를 비교한 결과, 어성초 뿌리의 킬레이트 효과(31.02%)는 EDTA(2%) 보다 현저하게 높은 유의성($p < 0.001$) 있는 억제력을 나타내었다. 이와 같이 300 μg 이상의 농도에서 EDTA 보다 높게 나타나는 것은 Fenton reaction에서 금속 이온 농도를 현저하게 감소시키기 때문인 것 같다(Fig. 4).

과산화수소에 대한 어성초 뿌리 메탄올 추출물의 소거효과

과산화수소에 대한 어성초 뿌리 추출물의 scavenging 효과는 Fig. 5와 같다. 100 μg 농도에서는 25.51%, 300 μg 농도에서 는 49.9%, 600 μg 농도에서는 32.39%, 1,200 μg 농도에서는 37.74%로서 100 μg 농도에서만 소거 효과가 아주 낮게 나타나는 반면 다른 농도에서는 소거 효과가 비교적 높게 나타났다. 이 소거 효과를 현재 사용되고 있는 합성 항산화제인 BHA, BHT와 천연 항산화

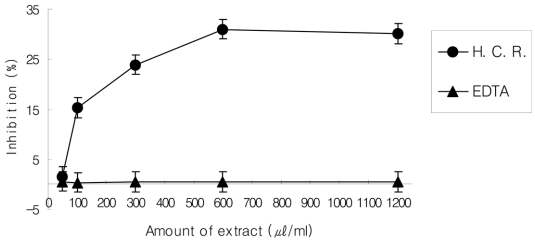

Fig. 4. Chelating effect of methanolic extract at different concentrations of the *Houttuynia cordata* root on ferrousion. HCR; *Houttuynia cordata* root, EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid.

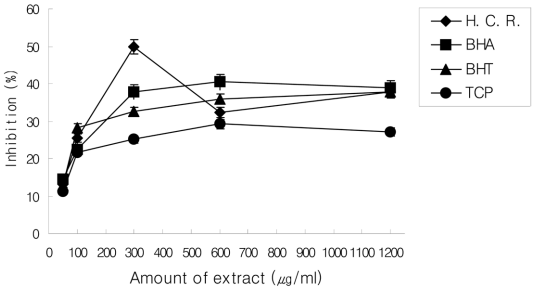

Fig. 5. Scavening effect of methanolic extract at different concentrations of *Houttuynia cordata* root on hydrogen peroxide. HCR; *Houttuynia cordata* root, BHA; Butylated hydroxyanisol, BHT; Butylated hydroxytoluene, TCP; Tocopherol.

제인 tocopherol과의 과산화수소 제거 효과를 비교한 결과 BHA 22.35~40.42%, BHT는 28.09~37.8%로서 농도에 따라 다소의 차이는 있으나 비슷한 제거 효과를 보인 반면, TCP는 21.6~29.18%로서 어성초 뿌리의 과산화수소 제거 효과 보다 낮게 나타났다($p < 0.05$) (Fig. 5).

OH radical에 대한 어성초 뿌리 메탄올 추출물의 소거 효과

어성초 뿌리 메탄올 추출액의 OH radical 제거효과는 Fig. 6과 같다. 어성초 뿌리의 OH radical 제거 효과는 100 ㎍에서 77%, 300 ㎍에서는 80%, 600 ㎍에서는 82%, 1,200 ㎍에서는 91%로 아주 높게 나타났다. 이러한 결과를 thiourea을 대조군 100%으로 하고 표준물질과 OH radical 제거효과를 비교한 결과 BHA 63~90%, BHT 79~92%와는 비슷한 효과를 보였으나, TCP 67~80% 보다는 어성초 뿌리의 OH radical 제거 효과가 높게 나타났다(Fig. 6).

2'-dG 산화 억제 효과 측정

2'-dG 산화 억제 효과를 Kasai와 Nishimura(1984)의 방

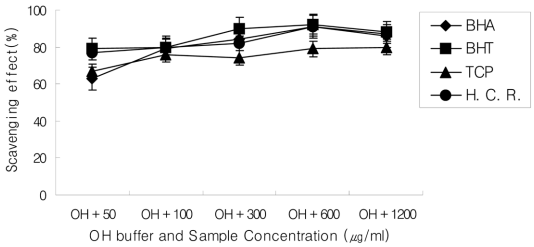

Fig. 6. Scavenging effect of methanolic extracts at different concentrations of the *Houttuynia cordata* root on hydroxyl radical. OH; Hydroxyl radical generation system (100 uM Vitamin C, 100 uM $CuSO_4$,12uM Cytochrome C), HCR; *Houttuynia cordata* root, BHA; Butylated hydroxyanisol, BHT; Butylated hydroxytoluene, TCP; Tocopherol.

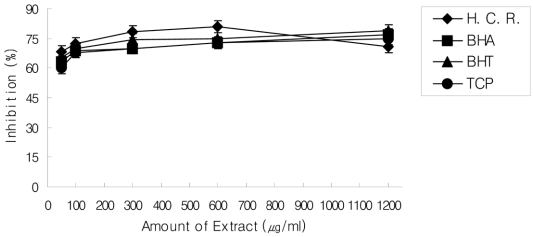

Fig. 7. Inhibitory effect of methanolic extracts of *Houttuynia cordata* root on 2'-deoxyguanosine oxidative damage. HCR; *Houttuynia cordata* root, BHA; Butylated hydroxyanisol, BHT; Butylated hydroxytoluene, TCP; Tocopherol.

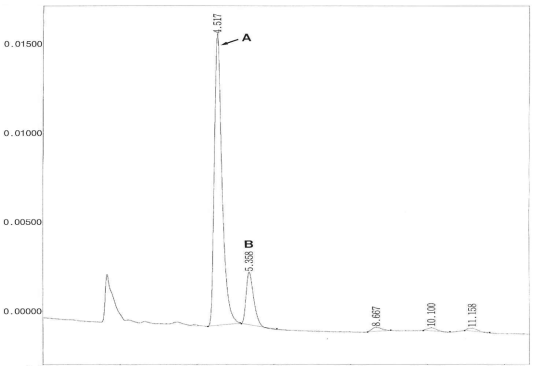

Fig. 8. HPLC chromatograms of 2'-deoxyguanosine oxidation. A; 2'-deoxyguanosine, B; 8-hydroyx-2-deoxyguanosin.

법에 따라 측정한 결과 100 ㎍에서는 72.3%, 300 ㎍에서는 78.3%, 600 ㎍에서는 81%, 1,200 ㎍에서는 91%를 나타내었다. 이 억제 효과를 합성 및 천연 항산화제인 BHA, BHT, TCP와의 산화 억제 효과를 비교한 결과 BHA는 70~77%, BHT는 70~79%, TCP는 68~75%로 나타나 어성초 뿌리의 억제 효과 보다 낮게 나타났다($p <$

0.05)(Fig. 7). 2'-dG와 8-OH-2'dG 성분을 확인하기 위하여 HPLC(Water, USA)로 분석한 결과, 2'-dG는 4.517분에, 8-OH-2'dG는 5.358분에서 그 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

고 찰

본 실험에서 lecithin liposome 산화에 대한 어성초 뿌리 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과 추출물의 농도에 따라 항산화 효과가 다양하게 나타난 것으로 보아 천연 항산화제의 항산화 효과는 산화되는 물질의 종류에 따라 다양하게 나타날 것으로 예측 되지만 기질로서 지질 사용 시는 천연 항산화제의 항산화 효과가 광범위하게 나타나는 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 Duh 등 [6]이 콩 껍질의 항 산화효과를 측정한 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 지질과산화를 직접 측정할 수 없기 때문에 간접적으로 측정하는 방법들이 다양하게 발표되어 있으며 그 중에서도 가장 널리 이용되는 방법은 지질이 산화된 후 생성되는 malondialdehyde(MDA)를 측정함으로서 지질의 과산화 정도를 알 수 있는데 이 MDA는 아민과 아질산염을 함유하고 있는 식품에서 N-nitrosamines의 형성을 촉진하는 역할을 할 뿐만 아니라 DNA와 단백질과 교차 반응을 일으켜 생체에 유해한 결과를 가져온다고 보고되어 있다 [13, 25]. Liposome 산화 손상에 대한 어성초 뿌리 추출물의 보호 효과를 측정한 결과, 600 μg/ml까지는 농도 의존 형으로 liposome peroxidation 억제능력이 증가하는 경향이나 1,200 μg/ml에서는 오히려 억제력이 약간 감소하는 경향을 보여 앞으로 연구나 실제 임상에 사용 시 600 μg/ml 이하의 농도를 사용하여야 최대의 효과를 얻을 것으로 판단된다. 현재 상업적으로 이용되고 있는 항산화제 BHA, BHT, TCP과의 항산화력을 비교한 결과 BHT 보다는 다소 떨어지지만 BHA와 TCP보다는 항산화 효과가 높게 나타났다. 이러한 결과는 Duh 등 [6]이 콩 껍질의 항 산화효과를 측정한 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 이는 많은 식물들이 항산화 효과를 나타내는 flavonoid를 함유하고 있기 때문이라 생각된다.

$FeCl_3$-EDTA와 hydrogen peroxide 혼합액을 deoxyribose와 같이 phosphate buffer(pH 7.4)에서 배양하면 OH radical이 산출되는데 생성된 OH radical은 deoxyribose에 달라붙어 많은 양의 MDA를 산출하게 된다고 한다 [9, 14]. 따라서 이 때 생성된 MDA의 색깔반응을 측정함으로서 항산화제의 항산화 능력을 알 수 있다고 Aruoma 등 [2]이 보고하였다. Zhao와 Jung [28]은 OH radical scavenger를 이 혼합 반응액에 첨가하면 deoxyribose에 붙어 있는 OH radical를 분리시키려고 경쟁적으로 반응을 하게 되며 이때 OH radical 제거제의 농도가 deoxyribose의 농도보다도 높으면 쉽게 OH radical을 deoxyribose로부터 분리하여 deoxyribose의 손상을 회복시킨다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 어성초 뿌리 추출물도 73.99%까지 deoxyribose의 손상 억제 효과를 보인 결과도 이와 같은 기전에 의하여 OH radical로 인하여 손상된 deoxyribose을 회복시킨 결과로 판단된다.

Stadman [24]은 아미노산 잔기는 OH radical의 공격을 받음으로써 단백질 산화가 일어나게 되고 이것은 결국 carbonyl 유도체로 변하게 된다. 따라서 이 변화된 carbonyl 유도체를 측정함으로서 어느 정도 단백질 산화가 일어났느냐를 측정할 수 있다고 보고하였다. 본 실험에서 사용한 어성초 뿌리의 메탄올 추출액들은 OH radical의 공격으로 인한 단백질 산화를 최소 85% 이상 억제하는 것으로 나타났는데 이러한 결과는 Antosiewicz 등 [1]이 쥐 간장 마이크로좀의 단백질과 지질 과산화에 대한 indolinci acid와 quinolinic aminoxylson 억제효과에 대한 결과와 일치하는 결과를 보였으나 Duh 등 [6]이 콩 껍질의 메탄올 추출액(MEMBH)을 사용하여 단백질 산화 억제시험을 측정한 결과 전혀 억제력이 없었다고 보고한 것과는 상이한 결과를 보였다. 이는 본 실험에서 사용한 어성초 뿌리의 메탄올 추출액과 MEMBH의 성분의 차이에서 오는 결과로 판단되며 이 추출액들이 이미 지질 과산화를 억제한 후 단백질 산화억제 기전에 관여하고 있음을 알 수 있으므로 보다 더 강력한 지질 및 단백질 산화 방지제라고 추측할 수 있다. 또한 본 실험에서 사용한 추출물은 합성 항산화제 BHA, BHT 및 천연 항산화제 보다 다소 낮은 단백질 산화 억제력을 보였지만 MEMBH 보다는 단백질 산화 억제가 뛰어난 항산화제라고 판단된다.

메탄올 추출물의 OH radical 제거효과는 용량이 증가할수록 제거효과가 증가하는 용량의존형으로 나타났다. 항산화제가 비지질의 과산화를 억제할 수 있느냐는 결국 OH radical을 얼마나 제거하느냐에 달려 있으며, Fig. 6에서 볼 수 있듯이 어성초 추출물이 비 지질의 과산화에 대해 현저한 억제능력을 나타낸 것은 hydroxy radical의 제거효과가 높게 나타난 것과 관련이 있는 것으로 판단된다.

Smith 등 [24]은 deoxyribose 손상을 중지시킬 수 있는 물질은 deoxyribose로부터 철이온을 불용성 염으로 전환시키고 Fenton reaction에서 이 이온을 불활성화 시키거나 또는 활성을 감소시킬 수 있다고 한다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 어성초 뿌리 추출물은 철이온의 킬레이트 효과를 보였는데 이는 추출물이 deoxyribose로부터 철이온을 불용성 염으로 전환시키고 Fenton reaction에서 이 이온을 불활성화 전환되었거나 또는 활성을 감소

시켜 deoxyribose 손상을 억제한 결과라고 볼 수 있다. 따라서 이러한 결과는 어성초 뿌리 추출물이 철이온과 결합할 수 있는 능력이 있음을 암시해 주며, 또한 liposome, deoxyribose, 단백질의 손상을 예방하는 효과는 이 철이온과 작용을 나타내기 때문인 것 같다.

Hydrogen peroxide는 DNA 상해를 유발하는 여러 물질 중 가장 강력한 활성 산소중의 하나 이다 [12]. 또한 hydrogen peroxide는 Fenton reaction에 의하여 OH radical을 생성함으로서 지질을 과산화시키고 세포에 독성작용을 나타낸다. 따라서 어성초 뿌리 추출물이 hydrogen peroxide을 제거하는 것은 세포의 과산화를 억제하는 효과를 가지고 있음을 나타낸다.

어성초 뿌리 추출물의 2'-dG 산화억제 효과를 Wilson 등 [28]의 방법에 따라 측정한 결과, 72.3~91% 억제율을 나타내어 BHA, BHT, TCP 보다 억제율이 높게 나타났다. 현재 사용되고 있는 합성 항산화제 인 BHA와 BHT는 발암과 같은 부작용이 유발될 수 있다는 보고를 고려해 볼 때 어성초 뿌리는 이들을 대체할 수 있는 잠재성 있는 천연 항산화제라고 판단되어지며, 이러한 결과는 Gilad 등 [9], Duh 등 [6]과 Wilson등 [28]이 항산화제를 사용한 결과 모두다 8-OH-2'dG 형성을 억제하는 경향이 있다고 보고한 것과 일치하지만 그 기전이 동일한지는 앞으로 규명하여야할 과제 이며, 어성초 뿌리 메탄올 추출물의 2'-dG 산화억제 효과 결과와 관련지어 볼 때 어성초는 미래 신약 개발의 좋은 자원이 될 것으로 판단된다.

결 론

어성초 뿌리의 메탄올 추출물이 비지질 과산화에 미치는 효과를 측정한 결과, Liposome model system에서는 600 μg에서 32.13%의 과산화 억제력을 보였고, deoxyribose 손상 시험에서는 300 μg에서 73.99%의 억제효과를 보였다. 단백질 과산화 억제효과를 측정한 결과 600 μg에서 88.29%의 억제효과를 보였으며, 철 이온 형성 억제 시험에서는 600 μg 농도에서는 31.02%의 억제효과를 보였다. 과산화수소 제거효과는 300 μg에서 49.9%의 제거효과를 보였으며, OH radical 제거효과는 1,200 μg 농도에서 91%의 높은 제거 효과를 보였다. 2'-dG 산화 억제 시험에서는 1,200 μg에서 91%의 산화억제 효과를 보였다.

이상의 결과로 보아 어성초 뿌리 메탄올 추출물은 각종 산화기전에 있어서 비지질 과산화를 예방하는 효과가 있음을 알 수 있고, 항산화 효과는 활성 산소종을 제거하여 나타나는 것으로 추측되지만 명확한 기전은 더 연구하여야 하겠다.

참고문헌

1. **Antosiewicz J, Popinigis J, Wozniak M, Damiani E, Carloni P, Greci L.** Effects of indolinic and quinolinic aminoxyls on protein and lipid peroxidation of rat liver microsomes. Free Radic Bio Med 1995, **18**, 913-917.
2. **Aruoma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Loligers J.** Antioxidant and pro-oxidant properities of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. Xenobiotica 1992, **22**, 257-268.
3. **Carter P.** Spectrophotometic determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). Anal Biochem 1971, **40**, 450-458.
4. **Cha BC, Lee SK, Lee HW, Lee E, Choi MY, Rhim TJ, Park HJ.** Antioxidative effect of domestic plants. Kor J Pharmacogn 1997, **28**, 15-20.
5. **Collins AR.** Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. Bioessays 1999, **21**, 238-246.
6. **Duh PD, Yen WJ, Du PC, Yen GC.** Antioxidant activity of mung bean hull. J Am Oil Chem Soc 1997, **74**, 1059-1063.
7. **Fang YZ, Yang S, Wu G**. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 2002, **18**, 872-879.
8. **Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R.** Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. J Am Oil Chem Soc 1997, **74**, 1309-1315.
9. **Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C.** Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. Life Sci 1997, **60**, PL169-174.
10. **Halliwell B, Gutteridge JM.** The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 1990, **280**, 1-8.
11. **Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI.** The deoxyribose method: a simple test-tubeassay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. Anal Biochem 1987, **165**, 215-219.
12. **Imaida K, Fukushima S, Shirai T, Ohtani M, Nakanishi K, Ito N.** Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of -glutamyl transpeptidase-positive foci development in the liver of rats. Carcinogenesis 1983, **4**, 895-899.
13. **Imlay JA, Linn S.** DNA damage and oxygen radical toxicity. Science 1988, **240**, 1302-1309.
14. **Kasai H, Nishiumura S.** Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. Nucleic Acids Res 1984, **12**, 2137-2145.

15. **Lass A, Suessenbacher A, Wolkart G, Mayer B, Brunner F.** Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. Mol Pharmacol 2002, **61**, 1081-1088.
16. **Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S.** Direct antioxidant properties of creatine. Biochem Biophys Res Commun 2002, **290**, 47-52
17. **Lenz AG, Costabel U, Shaltiel S, Lvine RL.** Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. Anal Biochem 1989, **177**, 419-425.
18. **Machlin LJ, Bendich A.** Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. FASEB J 1987, **1**, 441-445.
19. **Qi W, Reitor RJ, Tan DX, Garcia JJ, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR.** Chromium(III)-induced 8-hydroxyldeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. Environ Health Perspect 2000, **108**, 399-402.
20. **Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB.** Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg 199, **61**, 488-503.
21. **Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE.** Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant *catechins* isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis 1989, **10**, 1003-1008.
22. **Shi X, Dalal NS, Jain AC.** Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. Food Chem Toxicol 1991, **29**, 1-6.
23. **Sies H.** Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic Biol Med 1999, **27**, 916-921.
24. **Smith C, Halliwell B, Aruoma OI.** Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components. Food Chem Toxicol 1992, **30**, 483-489.
25. **Stadtman ER.** Protein oxidation and aging. Science 1992, **257**, 1220-1224.
26. **Tamura H, Shibamoto T.** Antioxidative activity measurement in lipid peroxidaton systems with malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. J Am Oil Chem Soc 1991, **68**, 941-943.
27. **van Loon AA, Groenendijk RH, van der Schans GP, Lohman PH, Baan RA.** Detection of base damage in DNA in human blood exposed to ionizing radiation at biologically relevant doses. Int J Radiat Biol 1991, **59**, 651-660.
28. **Wilson VL, Taffe BG, Shields PG, Povey AC, Harris CC.** Detection and quantification of 8-hydroxydeoxy-guanosine adducts in peripheral blood of people exposed to ionizing radiation. Environ Health Perspect 1993, **99**, 261-263.
29. **Wu G, Meininger CJ.** Arginine nutrion and cardiovascular function. J Nutr 2000, **130**, 2626-2629,
30. **Yen GC, Chen HY, Peng HH.** Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. J Agric Food Chem 1997, **45**, 30-34.
31. **Zhao MJ, Jung L.** Kinetics of the competitive degradation of deoxyribose and other molecules by hydroxyl radicals produced by the Fenton reaction in the presence of ascorbic acid. Free Radic Res 1995, **23**, 229-243.