

## 인간 HepG2 세포에서 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 분획물의 항산화 효과에 의한 세포보호 효과

김수현 · 최현진 · 오현택 · 정미자<sup>1</sup> · 최승필<sup>2</sup> · 함승시\*

강원대학교 식품생명공학전공, <sup>1</sup>강원대학교 BK21 사업단(뉴트라슈티컬바이오), <sup>2</sup>연변대학농학원 식품과학학부

### Cytoprotective Effect by Antioxidant Activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* Ethyl Acetate Fraction in Human HepG2 Cells

Soo-Hyun Kim, Hyun-Jin Choi, Hyun-Taek Oh, Mi-Ja Chung<sup>1</sup>, Cheng-Bi Cui<sup>2</sup>, and Seung-Shi Ham\*

Department of Food Science and Biotechnology, School of Biotechnology, Kangwon National University

<sup>1</sup>The Nutraceutical Bio Brain Korea 21 Project Group, Kangwon National University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Engineering, Agricultural College of Yanbian University

**Abstract** The objective of this study was to determine whether *Codonopsis lanceolata* or *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction (CLEA or PGEA) protect cells against sodium nitroprusside (SNP)-induced oxidative stress via the expression of various antioxidant systems. The HepG2 cells exposed for 24 hr to 0.5 mM SNP showed a reduction in the cell viability by an MTT assay. Pretreatment with CLEA and PGEA resulted in an inhibition of SNP-induced cell death. In addition, the effects of CLEA and PGEA on the expression of antioxidant systems via RT-PCR analyses was assessed. The levels of catalase (CAT), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and metallothionein (MT)-1A mRNA were increased after 24 hr of CLEA exposure. The levels of Mn superoxide dismutase CAT, G6PD, MT-1A, and MT-2A mRNA were increased after PGEA treatment. In conclusion, CLEA and PGEA exert indirect antioxidant effects, perhaps via the induction of a variety of antioxidant systems which, may protect cells against oxidative stress.

**Key words:** *Codonopsis lanceolata*, *Platycodon grandiflorum*, antioxidant, oxidative stress, antioxidant systems

## 서 론

우리나라는 65세 이상의 노인 인구가 증가하면서 노화를 포함한 각종 성인병 발생의 원인이 되고 있는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 관심이 높아지고 있다. 생체 내 정상적인 세포대사과정에서 생성되거나 여러 환경오염 및 화학물질의 노출 등에 의해 생성된 superoxide radical anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radicals(OH<sup>·</sup>) 등은 체내에서 세포막 손상, DNA 변성, 지질 산화, 단백질 분해 등을 초래하여, 뇌혈관 질환, 암 및 심혈관계 질환 등과 같은 만성질환들의 발생을 초래할 위험성을 증가시키고 있다(1-7).

그러나 생체 내에는 이러한 활성산소로부터 세포를 보호하기 위한 내인성 방어 시스템인 Cu/Zn superoxide dismutase(SOD1), Mn superoxide dismutase, catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR),  $\gamma$ -glutamyl-cystein synthetase(GCS), human glutathione-S-transferase(hGSTA1), glucose-6-phosphate-dehydrogenase 및 metallothioneins(MT-1A, MT-2A) 등의 항

산화 효소 및 단백질과 외인성 방어 시스템인 tocopherol, vitamin C, carotenoid, flavonoid, glutathione 그리고 합성 항산화제인 BHA, BHT, Trolox-C 등이 있다(8-10).

일반적으로 활성산소종들은 산화적 대사의 부산물로서, 약물이거나 환경독소와의 반응을 통해 혹은 항산화제의 양 감소 등에 의해 지속적으로 생성되어 산화적 손상 상태를 야기시키지만 이러한 활성산소종의 독성을 최소화하는 보호기전을 세포는 가지고 있다. 예를 들어 SOD는 O<sub>2</sub>가 한 개의 전자를 받아들여 형성된 superoxide anion을 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 환원시키는 작용을 함으로써 노화를 지연시키고, CAT는 적혈구와 간에 많이 존재하며 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 무독성의 H<sub>2</sub>O로 환원시키거나 hydrogen donor의 산화에 관여한다. GPx는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 glutathione의 반응을 촉진시켜 환원형 glutathione(GSH)를 산화형 glutathione(GSSG)으로 전환시키는 효소이며, GST(glutathione-S-transferase)는 셀레늄 비의존성 GSH-Px로서 친전자성 물질을 무독화시키는 과정을 촉매함으로써 조직의 과산화를 방지한다. 또한 세포에서 G6PD 활성이 감소되면 glutathione을 환원형으로 유지하는데 필수적인 NADPH를 생성할 수 없게 된다. 그 결과 세포의 해독기능이 저하되어 세포 내에서 생성되는 자유라디칼이나 과산화물을 제대로 해독하지 못하게 된다. 특히 인산 오탄당 경로가 NADPH를 생성하는 유일한 경로인 적혈구에서의 G6PD의 결핍은 심각한 문제를 야기시키기도 한다. GST는 제 2상 해독화 효소로서 GSH 포함을 촉매하여 독성 중간체 물질을 극성화시켜 체외로 배설시켜 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다.

생체내외의 방어 시스템을 증가시켜 산화를 방지하기 위한 수

\*Corresponding author: Seung-Shi Ham, Department of Food Science and Biotechnology, School of Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon, Gangwon-do 200-701, Korea  
Tel: 82-33-250-6453  
Fax: 82-33-250-6453  
E-mail: hamss@kangwon.ac.kr  
Received September 3, 2008; revised October 21, 2008;  
accepted October 31, 2008

많은 연구들 중 천연 항산화제 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 특히, Oh(11)는 강원도 산야에 자생하는 식물자원 중 생리활성이 강한 식물자원을 선별하고자 자생 목본류 127점, 산야초 및 식용 산채류 등 초본류 152점, 약용식물 41점 등 총 323 시료의 에탄올 추출물에 대한 DPPH radical 소거활성을 측정하였으며, Ko 등(12)은 항산화성 물질이 식품에 들어있는 유지의 산패 억제 작용을 하는 것은 물론 인체 내 항암 및 관상동맥 질환의 예방 등의 생리적 기능도 확인하였다.

한편 천연자원 중에서 더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있으며 한방에서 폐 기운을 돌리주고 가래를 없애주는 약제로 사용되어 강장, 해열, 거담, 해독 및 배농 등의 질병치료의 목적으로 사용되고 있다(13). 또한 더덕에는 saponin, inulin과 flavonoid 등의 성분을 많이 함유하고 있고 혈청 지질의 감소효과 및 항산화효과 등 여러 가지 생리활성이 있는 것으로 보고되었다(14-17). 도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 한방에서 약제로 사용되기도 하고 일반식용으로도 널리 이용되고 있는 산채식품으로서 triterpenoid계 사포닌, 당질 및 섬유질을 함유하고 있다. 이러한 triterpenoid계 사포닌은 동물실험에서 진해, 거담작용, 중추신경 억제작용, 급성 만성염, 항괴양 및 위액분비 억제작용, 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 혈당강화작용, 콜레스테롤 대사 개선작용, 항산화 및 항암효과 등이 있는 것으로 밝혀졌다(18-20).

활성산소종이 생체 내 이물이나 독소를 제거하는 동안 간에서 생성되고 이들 활성산소종에 의해 원인이 된 산화적 스트레스는 다양한 간 질병과 관련되어져 있다(21-23). 정상적인 조건의 세포 내에서 생성된 활성산소종은 간조직에 풍부한 내인성 항산화제에 의해 소거될 수 있다(24). 따라서 세포 내 항산화 방어시스템을 증가시킬 수 있는 항산화 물질 탐색 연구에서 쥐의 간과 인간의 간세포인 HepG2 세포를 모델로 사용하고 있으며(25-27) 본 연구에서도 더덕 및 도라지를 70% 에탄올로 추출한 후 hexan, chloroform, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물로 계층 분획하여 얻은 시료 중 폴리페놀 함량이 가장 높았던 에틸아세테이트 분획물이 HepG2 세포내 내인성 방어 시스템을 증가시켜 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는지 주요 항산화 유전자 발현 및 세포 생존율을 측정함으로써 알아보았다. 또한 이들 항산화 활성 탐색을 통해 천연 기능성 식의약 소재개발을 위한 기초 자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 더덕(*Codonopsis lanceolata*)과 도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 2007년 구룡제약(주)(Cheolwon, Korea)으로부터 분말형태로 제공받아 시료 100 g에 10배의 70% 에탄올을 가하여 80°C에서 8시간 동안 환류냉각하면서 3회 추출 후 뜨거운 상태에서 감압 여과하여 동결건조시켰다. 분획물의 제조는 hexan, chloroform, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층으로 계층분획한 후 에틸아세테이트 층만 농축 및 동결 건조하여 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 세포내 산화적 스트레스에 대한 억제효과

인간 간암세포인 HepG2(hepatoblastoma, KCLB No. 88065)는 Korea Cell Line Bank(Seoul, Korea)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. HepG2 세포는 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 1 mL씩 각 well에 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>와 37°C 조건에서 48시간 동안 배양시킨 후 예비실험을 통해 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 시료의 농도범위에서 MEM 배지에 농도별로 녹인 시료 1 mL씩 첨가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well의 상층액을 제거한 후 0.5 mM 농도의 SNP 용액 1 mL를 24시간 처리하여 산화적 스트레스 조건을 유발한 다음 SNP(sodium nitroprusside) 용액을 제거하였다.

배양이 끝난 세포의 생존율은 Chung 등(28)이 사용한 MTT 환원 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 각 well에 MTT 용액(5 mg/mL)을 FBS와 항생제가 첨가되어 있지 않은 MEM 배지의 10분의 1을 가해주고, 5% CO<sub>2</sub>와 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에 따라 나가지 않도록 배지를 조심스럽게 제거하였다. 남아 있는 배지를 완전히 제거하기 위해 실온에서 30분간 방치한 후 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 이용하여 용해시킨 시료를 Micro-Reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정 시 공시료는 DMSO로 하였고, 세포의 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = [\text{시료처리군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

### HepG2 세포에서 total RNA 분리

$5 \times 10^4$  cells/mL의 세포를 24 well plate에 분주하여 각 군마다 50 및 100 µg/mL의 농도로 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 분획물을 전 처리하여 배양하였다. 배양 시간이 끝난 후 배지를 제거 후 TRIzol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 mL를 가하여 완전히 용해시킨 후 TRIzol 용액 1 mL 당 0.2 mL의 chloroform을 넣고 15초간 잘 흔들어 준 후 실온에서 2-3분간 더 반응시켰다. 4°C에서 15분간 원심분리(12,000×g)하여 상층액을 잘 분리하여 다른 튜브로 옮긴 후 isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 그 후 4°C에서 10분간 원심분리(12,000×g) 후 상층액을 버리고 침전물에 75% DEPC(diethyl pyrocarbonate)-ethanol을 1 mL을 넣고 몇 번 흔들어 준 후 다시 4°C에서 5분간 원심분리(12,000×g) 하였다. 세척한 RNA는 건조 후 0.1% DEPC 증류수 995 µL에 용해하여 분광광도계(GE healthcare, Piscataway, NJ, USA)로 흡광도를 측정하여 RT-PCR에 이용하였다. 이때 260 nm와 280 nm의 비가 1.6 이상일 때 다음단계로 진행하였다.

### RT-PCR

분리한 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성하는 역전사 과정에서 Reverse Transcription System(Invitrogen)을 사용하였다. 즉, 먼저 oligo(dT)<sub>15</sub> primer(500 µg/mL) 1 µL와 dNTP mix(10 mM each) 1 µL를 동일량 섞어 PCR 튜브에 넣고 추출한 RNA와 RNase-free 증류수로 최종 부피가 12 µL가 되도록 맞추고 65°C에서 5분 동안 끓인 후 즉시 얼음에서 냉각시켰다. 5× first-strand 완충액 4 µL, DTT(Dithiothreitol, 100 mM) 2 µL, RNase-free 증류수 1 µL 및 Superscript™ II Reverse Transcriptase 1 µL를 첨가한 후 피펫으로 골고루 섞었다. 그 후 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 반응시켰다.

각 유전자 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer 염기서열은 출판되어진 것을 사용하였고(29), Table 1에 나타내었다. Table 2와 같은 조건에서 SOD1, SOD2, CAT, GPx, GR, GCS, hGSTA1, G6PD, MT-1A 및 MT-2A의 mRNA의 발현 정도를 측정하였고, 18S를 내부 표준 유전자로 사용하였다. PCR 최종 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel에 100V에서 30분간 전기영동 한 후 image analysis

Table 1. Primers used for RT-PCR\*

Gene	Forward	Reverse
SOD1	5'-AAG GCC GTG TGC GTG CTG AA-3'	5'-CAG GTC TCC AAC ATG CCT CT-3'
SOD2	5'-GCA CAT TAA CGC GCA GAT CA-3'	5'-AGC CTC CAG CAA CTC TCC TT-3'
CAT	5'-AAG GTT TGG CCT CAC AAG G-3'	5'-CGG CAA TGT TCT CAC ACA G-3'
GPx	5'-GTG TAT GCC TTC TCG GCG CG-3'	5'-CGT TGC GAC ACA CCG GAG AC-3'
GR	5'-CAG TGG GAC TCA CGG AAG AT-3'	5'-TTC ACT GCA ACA GCA AAA CC-3'
GSC	5'-GGG GAA CCT GCT GAA CTG-3'	5'-GCT CCA AGG AAA GAT TAA CTC C-3'
hGSTA1	5'-TCC ATA TGG CAG GAG AGC CCA AGC-3'	5'-CCG AAT TCT CCA TGA CTG CGT TAT TA-3'
G6PD	5'-CCG GAT CGA CCA CTA CCT GGG CAAG-3'	5'-GTT CCC CAC GTA CTG GCC CAG GAC CA-3'
MT-1A	5'-CTC GAA ATG GAC CCC AACT-3'	5'-ATA TCT TCG AGC AGG GCT GTC-3'
MT-2A	5'-CCG ACT CTA GCC GCC TCTT-3'	5'-GTG GAA GTC GCG TTC TTT ACA-3'
18S rRNA	5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3'	5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT GC-3'

\*Abbreviations: Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn superoxide dismutase (SOD2), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR),  $\gamma$ -glutamyl-cystein synthetase (GCS), human glutathione-S-transferase (hGSTA1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), metallothioneins (MT-1A, MT-2A)

Table 2. Amplification conditions for RT-PCR\*

(unit: °C)

Gene	SOD1	SOD2	CAT	GPx	GR	GCS	hGSTA1	G6PD	MT-1A	MT-2A	18S rRNA
Initial denaturation	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
Further denaturation	95	95	95	95	95	95	94	95	95	95	94
Annealing	52	52	52	60	62	52	60	95	55	55	60
Extension	72	72	72	72	72	72	72	50	72	72	72
Final extension	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
Cycle	22	23	22	25	21	27	26	21	25	20	16

\*Abbreviations: Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn superoxide dismutase (SOD2), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR),  $\gamma$ -glutamyl-cystein synthetase (GCS), human glutathione-S-transferase (hGSTA1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), metallothioneins (MT-1A, MT-2A)

wokrstation(Slimline™ series, Spectra Services Inc., Ontario, NY, USA)를 이용하여 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 SigmaGel(Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

### 통계처리

실험 결과는 mean±SD로 표시하였으며 SPSS 프로그램(Version 10.0, SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고, 각 측정 평균값 간의 유의성은  $p < 0.05$  수준으로 던컨의 다중범위시험법(Duncan's multiple range test)으로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

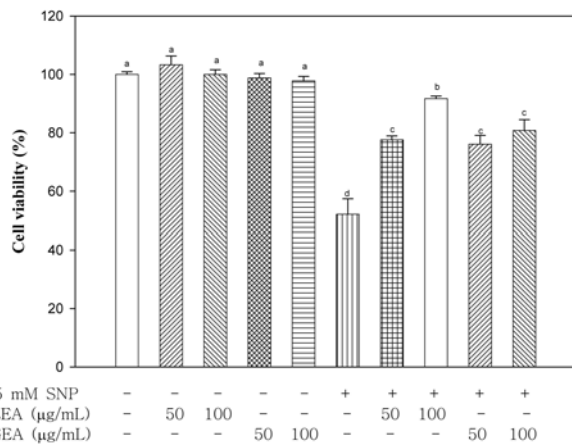
### 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 추출물 처리에 의한 세포내 산화적 스트레스 억제효과

더덕 및 도라지를 70% 에탄올로 추출 후 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층으로 계통분획하여 폴리페놀 함량을 측정 한 결과 에틸아세테이트 층이 가장 많이 함유하고 있었다(결과미제시). 따라서 폴리페놀 함량이 가장 높았던 에틸아세테이트 층을 실험에 사용하였다. 그리고 더덕 및 도라지의 70% 에탄올 추출물의 수율은 각각 37.5% 및 44.7%이며 에틸아세테이트 분획물의 수율은 각각 1.9% 및 1.4%였다.

Fig. 1은 HepG2 세포에 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 추출물을 처리한 후 세포내에서 NO를 생성시키는 SNP를 처리하여 산화적 스트레스를 유발시켰을 때 세포 생존율에 미치는 영향을 나타내었다. 아무 것도 처리하지 않은 무처리군, SNP를 처리한

대조군 그리고 대조군에 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리한 실험군을 비교하였다. 그 결과 무처리군의 세포 생존율을 100%라고 보았을 때, 대조군의 세포 생존율은 52.1%로 나타났으며 더덕 에틸아세테이트 분획물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 각각 세포에 처리했을 때 HepG2 세포주의 생존율은 77.5% 및 91.4%로써 농도 의존적으로 증가하였다. 도라지 에틸아세테이트 분획물의 경우에도 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 각각 76.2% 및 80.8%로 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 따라서 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 추출물 처리가 산화적 스트레스로부터 세포를 보호해 주었고, 이와 같은 효과는 저농도에서는 두 추출물이 유사한 결과를 나타냈으나, 고농도에서 도라지보다는 더덕이 더 효과적으로 산화적 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하였다.

Lee 등(30)은 *tert*-butylhydroperoxide 처리에 의해 산화적 스트레스가 유도된 rat primary 간세포에서 시토졸의 LDH 양의 증가, 세포내 GSH 소모 및 지질과산화의 증가로 세포 생존율이 감소하였으나 도라지에서 분리한 사포닌을 0.5-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여한 결과, 농도 의존적으로 세포독성이 유의적으로 감소하였다고 보고하였으며, Lee 등(31)은 LLC-PK1 세포주에  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 산화적 스트레스를 유발하여 인삼 사포닌 Rg1을 12-250  $\mu\text{M}$  투여했을 때, 농도 의존적으로 세포독성이 감소하였다고 보고하였고 Kim 등(32)은  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 V79-4 세포주의 산화적 스트레스 방어효과를 실험한 결과, 효소처리한 백삼 저분자 화합물 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 무처리군에 비하여 80%의 세포 생존도의 증가가 관찰되었다고 보고하였다. Chung 등(25,33)은 아연, caffeic acid 그리고 Trolox 같이 잘 알려져 있는 항산화제를 세포에 전처리 후 SNP로 세포내 NO



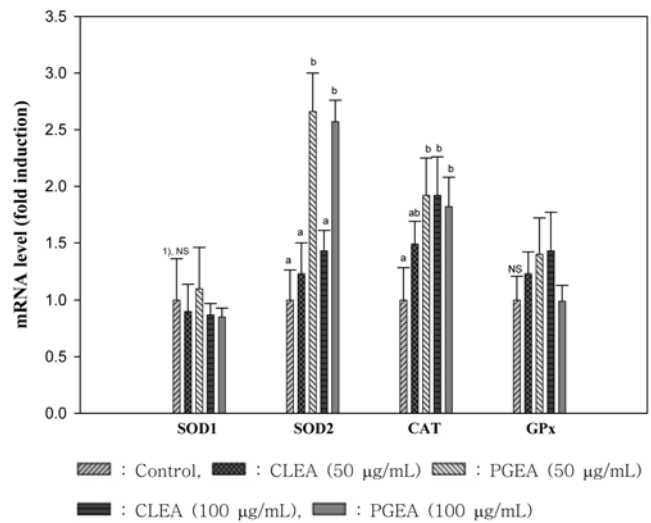
**Fig. 1.** Effects of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction against SNP (sodium nitroprusside)-induced cytotoxicity. HepG2 cells were incubated with 0.5 mM SNP (24 hr) and/or with *C. lanceolata* (CLEA) and *P. grandiflorum* ethyl acetate fraction (PGEA) and their viability was assessed by MTT assay. <sup>1)</sup>Results are from three experiments and are expressed as mean±SD. <sup>a-d)</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

를 유발시켜 산화적 스트레스를 유도하였을 때 이들 항산화제가 산화적 스트레스에 대항하여 세포 생존율을 높여 주었다고 보고 하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보여 주었다.

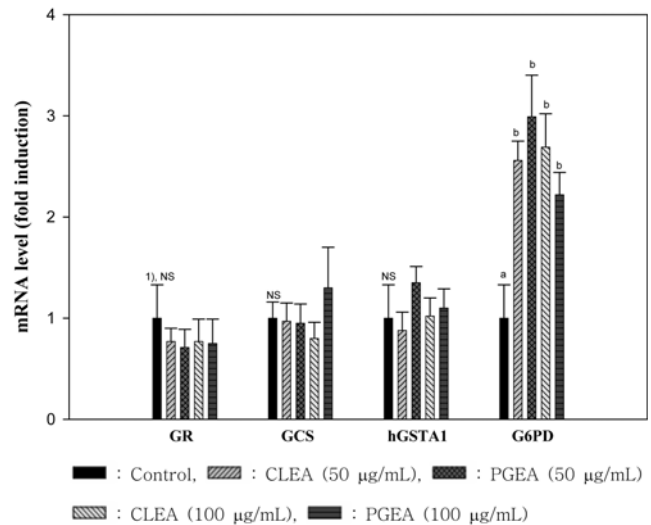
**더덕 및 도라지 에틸아세테이트 추출물 처리에 의한 항산화 유전자 발현에 미치는 영향**

더덕 및 도라지 에틸아세테이트 추출물이 세포내 항산화 방어 시스템인 4개의 주요 효소들(SOD1, SOD2, CAT와 GPx), glutathione 대사에 관여하는 효소들(GR, GCS, hGSTA1과 G6PD) 및 그 외의 항산화 유전자(MT-1A와 MT-2A)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 알아본 결과를 Fig. 2-4에 나타내었다. 더덕 에틸아세테이트 분획물을 100 µg/mL로 투여 시 CAT의 mRNA의 수준이 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나 SOD1, SOD2 및 GPx의 mRNA는 유의적으로 변하지 않았다. 그러나 도라지 에틸아세테이트 분획물의 경우, 50 µg/mL 및 100 µg/mL로 투여하였을 때 SOD2와 CAT의 mRNA 수준이 유의적으로 증가하였다(Fig. 2). 더덕과 도라지 에틸아세테이트 분획물이 glutathione 대사에 관여하는 효소들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 살펴본 결과, 모두에서 GR, GCS 및 hGSTA1 mRNA의 발현 수준은 유의적으로 변하지 않았으나 G6PD의 경우는 50 µg/mL 및 100 µg/mL로 세포에 투여했을 때 대조군에 비하여 모두 유의적으로 증가하였다(Fig. 3). 또한 도라지 에틸아세테이트 분획물을 50 µg/mL 및 100 µg/mL로 세포에 투여했을 때 MT-1A 및 MT-2A의 mRNA의 수준이 모두 유의적으로 증가하였으나 더덕 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 50 µg/mL로 처리하였을 경우에만 MT-1A의 mRNA 수준이 유의적으로 증가하였다(Fig. 4).

이러한 결과는 Lee 등(20)의 도라지를 석유 에테르와 에틸에테르를 8:2로 혼합하여 추출하였을 때 가장 강한 항산화력을 나타내었다는 연구와 비슷한 결과이며 Han과 Cho(15)는 사염화탄소를 투여한 흰쥐에게 더덕 열수 추출물을 투여함으로써 xanthine oxidase, GST의 활성은 감소한 반면 surperoxide dismutase의 활성은 증가시킨다고 보고하였으며, Chung 등(25,28,33,34)은 식이적 항산화제인 genistin, caffeic acid와 Trolox로 인간 간세포인



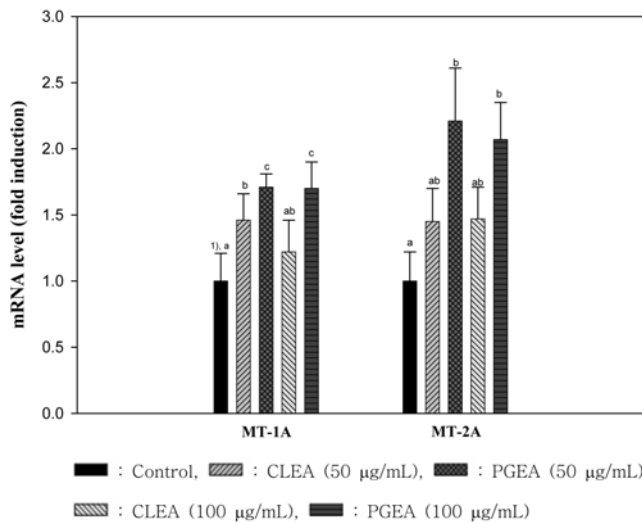
**Fig. 2.** Effect of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction on the expression of SOD1, SOD2, CAT and GPx mRNA. <sup>1)</sup>Results are from three experiments and are expressed as mean±SD. <sup>a-b)</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. NS=Not significantly ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: SOD1=Cu/Zn superoxide dismutase, SOD2=Mn superoxide dismutase, CAT=catalase, GPx=glutathione peroxidase.



**Fig. 3.** Effect of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction on the expression of GR, GCS, hGSTA1 and G6PD mRNA. <sup>1)</sup>Results are from three experiments and are expressed as mean±SD. <sup>a-b)</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. NS=Not significantly ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: GR=glutathione reductase,  $\gamma$ -glutamyl-cystein synthetase (GCS), hGSTA1=human glutathione-S-transferase, G6PD=glucose-6-phosphate dehydrogenase.

HepG2와 물고기 아가미 세포에 처리했을 때 G6PD, MTs 그리고 GST mRNA 수준이 대조군과 비교하여 현저히 증가하였고, 이들 항산화 유전자들의 증가가 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하였다고 하였다.

본 실험에서 더덕 에틸아세테이트 분획물 처리에 의해 세포내 G6PD, CAT 및 MT-1A mRNA의 발현 수준이 증가하였고, 도라



**Fig. 4. Effect of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction on the expression of MT-1A and MT-2A mRNA.** <sup>1)</sup>Results are from three experiments and are expressed as mean±SD. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Metallothioneins (MT-1A, MT-2A).

지 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 SOD2, CAT, G6PD, MT-1A 및 MT-2A mRNA의 유전자 발현이 증가하였다. 따라서 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 분획물은 세포내 항산화 방어 시스템을 가동시키므로 산화적 스트레스로부터 세포를 보호해 줄 것으로 추정된다. 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 분획물의 방어 시스템 증가에 의한 세포내 활성산소종 제거작용은 이들 분획물이 각종 질병예방에 유익한 식·의약 소재로 활용 가능성 및 화장품 소재 등 다양한 분야에 기능성 소재로 이용될 수 있을 가능성을 시사하고 있다.

## 요 약

이 연구의 목적은 더덕 및 도라지 에틸아세테이트 분획물(CLEA 나 PGEA)이 다양한 항산화 시스템을 가동시켜 sodium nitroprusside(SNP)에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대하여 세포를 보호해 줄 수 있을지 연구하는 것이다. 0.5 mM의 SNP를 HepG2 세포주에 24시간 동안 노출시켰을 때 세포 생존율이 감소하였으나, CLEA와 PGEA 처리에 의해 SNP 노출에 의한 세포 생존을 감소가 저해되었다. 또한 항산화 시스템들 발현에 미치는 CLEA와 PGEA의 영향을 RT-PCR로 알아보았다. Catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD) 그리고 metallothionein (MT)-1A mRNA 수준이 CLEA를 세포에 24시간 동안 처리한 후 증가하였고, Mn superoxide dismutase, catalase, G6PD, MT-1A 와 MT-2A mRNA 수준이 PGEA 처리에 의해 증가하였다. 우리는 CLEA와 PGEA가 아마 다양한 항산화 시스템들을 증가시키는 간접적인 항산화 효과를 나타내며, 이들 효과들이 산화적 스트레스로부터 세포를 보호해 줄 것이라 추정하였다.

## 감사의 글

2008년도 강원지역바이오인력사업단 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Yu BP. Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free Radical Bio. Med.* 21: 651-668 (1996)
2. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* 275: 257-266 (1992)
3. Biesalski HK. Free radical theory of aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* 5: 5-10 (2002)
4. Oh MH, Chung HY, Yang HS, Kim KW, Hikokichi O, Takako Y. Effects of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on the antioxidants in SAM-R/1 mice. *Korean Biochem. J.* 25: 492-497 (1992)
5. Kim SK, Lee HJ, Kim MK. Effect of water and ethanol extracts of persimmon leaf and green tea different conditions on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. *Korean J. Nutr.* 34: 499-512 (2001)
6. Oh HM, Kim MK. Effect of dried leaf powders, water, and ethanol extracts of persimmon and green tea leaves on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. *Korean J. Nutr.* 34: 285-298 (2001)
7. Sung IS, Park EM, Lee MK, Han EK, Jang JY, Cho SY. Effects of acorn extracts on the antioxidative enzyme system. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 494-500 (1997)
8. Block G, Langseth L. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food. Technol.* 48(7): 80-84 (1994)
9. Fukuzawa K, Takaishi Y. Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free Rad.* 1: 55-70 (1990)
10. Hatano T. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Nat. Med.* 49: 357-363 (1995)
11. Oh HS. Studies on biological activities of the plant resources of Gangwon-do: Focused on the *Acer ginnala* Max. PhD thesis, Gangwon National University, Chuncheon, Korea (2005)
12. Ko MS, Shin KM, Lee MY. Effects of *Hijikia fusiforme* ethanol extract on antioxidative enzymes in ethanol-induced hepatotoxicity of rat liver. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 87-91 (2002)
13. Lee YE, Hong SH. *Natural Food Material*, Kyomunsa Publishers Inc., Seoul, Korea. pp. 150-151 (2003)
14. Choi MS, Choi PS. Plant regeneration and saponin contents in *Codonopsis lanceolata* L. *Korean J. Med. Crop Sci.* 7: 275-281 (1999)
15. Han EG, Cho SY. Effects of *Codonopsis lanceolata* water extract on the activities of antioxidative enzymes in carbon tetrachloride treated rats. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 1181-1186 (1997)
16. Han EG, Sung IS, Moon HG, Cho SY. Effects of *Codonopsis lanceolata* water extract on the level of lipid in rats fed high fat diet. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 940-944 (1998)
17. Maeng YS, Park HK. Antioxidant activity of ethanol extract from *Ddodok* (*Codonopsis lanceolata*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 311-316 (1991)
18. Kim KS, Osamu E, Shinji I, Hiroshige I. Effects of *Platycodon grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 41: 485-491 (1995)
19. Lee JY, Hwang WI, Lim ST. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 13-21 (1998)
20. Lee JY, Hwang WI, Lim ST. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *J. Ethnopharmacol.* 93: 409-415 (2004)
21. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck Arch. Surg.* 391: 499-510 (2006)
22. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 5: 145-152 (2006)
23. Comelli MC, Mengs U, Schneider C, Prosdocimi M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: Activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integr. Cancer Ther.* 6: 120-129 (2007)
24. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162 (2004)

25. Chung MJ, Hogstrand C, Lee SJ. Cytotoxicity of nitric oxide is alleviated by zinc-mediated expression of antioxidant genes. *Exp. Biol. Med.* 231: 1555-1563 (2006)
26. Chung MJ, Sung NJ, Park CS, Kweon DK, Alberto M, Moon TW, Lee SJ, Park KH. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice. *Eur. J. Pharmacol.* 578: 159-170 (2008)
27. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur. J. Pharmacol.* 591: 66-72 (2008)
28. Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. ZINC-mediated gene expression offers protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* 205: 225-236 (2005)
29. Schmidt AJ, Heiser P, Hemmeter UM, Krieg JC, Vedder H. Effect of antidepressants on mRNA levels of antioxidant enzymes in human monocytic U-937 cells. *Prog. Neuro-Psychoph.* 32: 1567-1573 (2008)
30. Lee KJ, Choi CY, Chung YC, Kim YS, Ryu SY, Roh SH, Jeong HG. Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on *tert*-butylhydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 147: 271-282 (2004)
31. Lee YS, Yoo JM, Shin HW, Kim DH, Lee YM, Yun YP, Hong JT, Oh S, Yoo HS. Protective effect of ginsenoside Rg1 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death by the decreased ceramide level in LLC-PK1 cells. *J. Ginseng Res.* 30: 1-7 (2006)
32. Kim YC, Yim JH, Rho JH, Cho CW, Rhee YK. Antioxidant activity of white ginseng extracts prepared by enzyme treatment on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J. Ginseng Res.* 31: 203-209 (2007)
33. Chung MJ, Walker PA, Hogstrand C. Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and Trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. *Aquat. Toxicol.* 80: 321-328 (2006)
34. Chung MJ, Kang AY, Lee KM, Oh E, Jun HJ, Kim SY, Auh JH, Moon TW, Lee SJ, Park KH. Water-soluble genistin glycoside isoflavones up-regulate antioxidant metallothionein expression and scavenge free radicals. *J. Agr. Food Chem.* 54: 3819-3826 (2006)