

## 인간 HepG2 Cell에서 항산화 효소의 mRNA 발현에 대한 잔대 에틸아세테이트 추출물 효과

최현진<sup>1</sup> · 김수현<sup>1</sup> · 오현택<sup>1</sup> · 정미자<sup>2</sup> · 최승필<sup>3</sup> · 함승시<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 BT특성화학부(대학) 식품생명공학전공

<sup>2</sup>강원대학교 BK21 사업단(뉴트라슈티컬 바이오)

<sup>3</sup>중국 연변대학교

## Effects of *Adenophora triphylla* Ethylacetate Extract on mRNA Levels of Antioxidant Enzymes in Human HepG2 Cells

Hyun-Jin Choi<sup>1</sup>, Soo-Hyun Kim<sup>1</sup>, Hyun-Taek Oh<sup>1</sup>, Mi-Ja Chung<sup>2</sup>,  
Cheng-Bi Cui<sup>3</sup>, and Seung-Shi Ham<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Biotechnology, School of Biotechnology, Kangwon National University

<sup>2</sup>The Nutraceutical Bio Brain Korea 21 Project Group, Kangwon

National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>3</sup>Yan Bian University, Yanji, China

### Abstract

The root of *Adenophora triphylla* is widely used as traditional herbal medicine in Korea. We studied its effects on sodium nitroprusside (SNP) cytotoxicity and antioxidant genes expression in HepG2 cells. To study whether *Adenophora triphylla* ethylacetate extract (ATea) inhibited NO-induced cell death, HepG2 cells were preincubated for 24 hr with 50 and 100 µg/mL ATea followed by 24-hr exposure to 0.5 mM SNP (exogenous NO donor). No-induced cytotoxicity was inhibited by pretreatment of ATea, as assessed by mitochondrial dehydrogenase activity (MTT assay). We further investigated the effects of ATea on mRNA levels of various enzymes of the antioxidant system such as Cu, Zn superoxide dismutase (SOD 1), Mn SOD (SOD 2), glutathione peroxidase (GPx), catalase and several enzymes of the glutathione metabolism [glutathione reductase (GR), γ-glutamyl-cystein synthetase (GCS), glutathione-S-transferase (GST), γ-glutamyltranspeptidase (γ-GT), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)] by RT-PCR. CAT, GCS, GR and G6PD mRNA levels were increased after treatment with ATea. The SOD 1, SOD 2, GPx, GST and γ-GT mRNA levels were not affected in ATea-treated HepG2 cells. We concluded that ATea have an indirect antioxidant effects, perhaps via induction of CAT, GCS, GR and G6PD.

**Key words:** cytotoxicity, antioxidant genes, *Adenophora triphylla*, glutathione metabolism

### 서 론

생체 내에는 정상적인 대사과정에서나, 외부적인 원인으로 superoxide anion(O<sup>2-</sup>), hydroxy radical(·OH)와 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등의 자유기 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 존재한다(1,2). 이는 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하고 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 지질 과산화, 세포막 변화, 단백질 산화 및 DNA 변성 등을 유발하여 암, 심장질환, 동맥경화 및 자가면역질환 등의 각종 질병을 야기하는 것으로 알려져 있다(3-6). 그러나 세포에는 이러한 활성산소종의 폐해로부터 세포를 방어하는 항

산화 방어체계가 있는데, 그 중 대표적인 것이 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase (CAT), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD) 등의 항산화 효소들이 있다. 이들은 활성산소종에 의한 연쇄 반응의 개시를 저해시키는 작용을 하는데 SOD는 과산화 음이온을 과산화수소로 바꾸어주고, CAT는 과산화수소를 분해함으로써 과산화 음이온의 작용으로부터 세포를 보호하게 된다. 또한 GPx는 GR과 함께 작용하여 과산화수소를 물과 산소로 분해 시켜서 과산화수소와 환원형 glutathione으로부터 물과 산화형 glutathione을 만들고, GR은 산화형 glutathione을 다시 환원형 glutathione으로 환원시키는 역

\*Corresponding author. E-mail: hamss@kangwon.ac.kr  
Phone: 82-33-250-6453, Fax: 82-33-250-6453

할을 한다(7-10).

최근에는 이와 같은 유해 활성산소나 라디칼을 제거함으로써 질병을 예방·치료하고자 하는 움직임이 활발하여, 천연 식물성 소재를 이용한 건강 기능성식품을 섭취하여 이와 관련하여 산화방지 효능을 얻고자 하는 노력이 진행되고 있다(11-14).

잔대의 학명은 *Adenophora triphylla* var. *japonica* Hara이며 사삼(沙蔘), 딱주, 제니 등 다양한 이름으로 불리어지고 있으며, 한국, 일본, 중국 및 타이완 등지에 널리 분포되어 있는 여러해살이풀로서 온 몸에 털이 있고 도라지와 같은 굵은 뿌리를 가지고 있다. 뿌리를 약재로 많이 사용되어지고 있으며, 뿌리의 주요 유용성분은 더덕, 도라지와 같이 사포닌이고, 진해, 거담, 강장과 소종 등에 효능이 있다(15,16). 잔대 뿌리는 독을 풀어주는 힘이 강하여 다양한 종류의 독으로 인하여 생기는 질병에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(15,16). Gum 등(17)은 아세트아미노펜에 의해 유도된 간독성 모델에서 잔대 추출물이 간세포의 해독화 효소의 발현을 증가시키므로 간 손상을 억제하였다고 보고하였다. 그 외 crude saponin(18) 성분분석, 잔대의 성분에 관한 연구(19) 등의 보고들이 있지만 잔대에 관한 연구는 현재까지 미흡하게 진행되어져 오고 있다.

따라서 본 연구에서는 천연물 소재인 잔대 추출물의 항산화 효과에 대한 연구의 일환으로 6개의 잔대 분획물 중 폴리페놀 성분이 가장 많이 함유된 잔대 에틸 아세테이트 추출물을 인간 간세포인 HepG2에 전 처리한 후 산화적 스트레스를 주었을 때 이들 추출물이 산화적 스트레스에 대항하여 세포를 보호할 수 있는지를 알아보았다. 더하여 이들 세포가 산화적 스트레스에 의해 세포를 보호할 수 있다면 어떤 기작에 의해 이와 같은 보호 작용이 있는지 알아보기 위해, 잔대 에틸아세테이트 추출물이 세포내 항산화 방어시스템인 4개의 주요 효소들(SOD 1, SOD 2, GPx와 CAT) 및 glutathione 대사에 관여하는 효소들(GR, GCS, GST,  $\gamma$ -GT와 G6PD)에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

Minimum essential medium(MEM/EBSS), HEPES buffer, fetal bovine serum(FBS) 및 Trypsin-EDTA는 Hyclone 사(Logan, UT)로부터 구입하였다. Sodium nitroprusside(SNP), 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), dimethylsulfoxide(DMSO)와 diethyl pyrocarbonate(DEPC)는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, TRIZOL reagent, oligo(dT)<sub>15</sub> primer, dNTP, RNase-free water, 5X first-strand 및 Superscript II Reverse Transcriptase는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. GoTaq

Green Master Mix는 Promega(Madison, WI, USA)에서 그리고 oligonucleotide primers는 Bioneer(Daejun, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 인간 간암 세포 HepG2는 Korea Cell Line Bank(Seoul, KCLB)로부터 분양받았다.

### 시료의 추출 및 분획

본 실험에서 사용한 시료는 강원도에서 재배되고 있는 잔대뿌리를 분말화한 후 시료 중량 10배의 70% 에탄올을 첨가하고 8시간씩 80°C에서 3회 추출한 후, 뜨거운 상태에서 감압여과를 거쳐 감압 농축기를 사용하여 추출 용매를 제거한 후 동결건조 하였다. 분획물의 제조는 동결 건조한 시료를 물에 녹인 후 용매의 극성에 따라 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올과 물층으로 분별 분리하여 극성의 차이에 따라 분리한 후에 에틸아세테이트 층만 감압농축 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

### 세포내 산화적 스트레스에 대한 억제효과

인간에게 산화적 스트레스를 가했을 때 잔대 에틸아세테이트 추출물이 산화적 스트레스에 대항하여 얼마나 간을 보호할 수 있는지 알아보기 위하여 인간 간암세포인 HepG2를 이용하여 SNP를 처리하였다. HepG2를 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/mL 농도로 1 mL씩 각 well에 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 동안 배양시킨 후 MEM/ENSS에 0, 50 그리고 100  $\mu$ g/mL의 잔대 에틸아세테이트 추출물을 녹인 시료를 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 용액을 제거하였다. 배양이 끝난 세포의 생존율은 Chung 등(20)이 사용한 MTT환원 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 각 well에 FBS와 항생제가 첨가되어 있지 않은 성장배지(MEM/EBSS)의 10분의 1에 해당되는 MTT 용액(5 mg/mL)을 가해주고 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켰다. 그 후 배지를 제거하고 실온에서 30분간 건조시킨 후 DMSO를 이용하여 용해시킨 시료를 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Total RNA의 추출 및 RT-PCR

HepG2 세포( $5 \times 10^4$ )를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 동안 배양시킨 후 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 0, 50 그리고 100  $\mu$ g/mL의 잔대 에틸아세테이트 추출물을 처리한 후 24시간 배양하였다. 그 다음 상층액을 제거한 후 TRIZOL reagent 처리하였다. RNA 추출은 Invitrogen(USA)사에서 제공하는 제품 사용설명서에 따라 수행하였고, 추출한 RNA 5  $\mu$ L을 0.1% DEPC를 처리한 물(995  $\mu$ L)에 희석시킨 후 260과 280 nm에서 흡광도를 측정하여 이들 비가 1.7 이상일 때 다음 단계를 진행하였다. RNA 농도는 260 nm의 흡광도 값  $\times 40 \mu$ g/mL  $\times$  희석배수로 계산하였다. cDNA 합성은 oligo(dT)<sub>15</sub> primer(500  $\mu$ g/mL) 1  $\mu$ L, dNTP Mix(10 mM) 1

Table 1. PCR primer sequences

Gene	Primer	Sequence
SOD1	Sense	5'-AAG GCC GTG TGC GTG CTG AA-3'
	Antisense	5'-CAG GTC TCC AAC ATG CCT CT-3'
SOD1	Sense	5'-GCA CAT TAA CGC GCA GAT CA-3'
	Antisense	5'-AGC CTC CAG CAA CTC TCC TT-3'
GPx	Sense	5'-GTG TAT GCC TTC TCG GCG CG-3'
	Antisense	5'-CGT TGC GAC ACA CCG GAG AC-3'
CAT	Sense	5'-AAG GTT TGG CCT CAC AAG G-3'
	Antisense	5'-CGG CAA TGT TCT CAC ACA G-3'
GCS	Sense	5'-GGG GAA CCT GCT GAA CTG-3'
	Antisense	5'-GCT CCA AGG AAA GAT TAA CTC C-3'
GST	Sense	5'-CGG AGA CCT CAC CCT GTA CCA GTC-3'
	Antisense	5'-GCA GCA AGT CCA GCA GGT TGT AGT CA-3'
$\gamma$ -GT	Sense	5'-GAT CCT GTC AGC CCT GGG TTG TAA GA-3'
	Antisense	5'-CGT CTA CGA TGA TAT GAC CCT TGT CAT T-3'
GR	Sense	5'-CAG TGG GAC TCA CGG AAG AT-3'
	Antisense	5'-TTC ACT GCA ACA GCA AAA CC-3'
G6PD	Sense	5'-GTC ACC AAG AAC ATC AAG CAC-3'
	Antisense	5'-CAG TGG GGT CAT CAA GGT AAC-3'
18S	Sense	5'-GAG CCT GAG AAA CGG CTA C-3'
	Antisense	5'-CCC ATT ATT CCT AGC TGC G-3'

SOD1: Cu,Zn superoxide dismutase, SOD2: Mn superoxide dismutase, GPx: glutathione peroxidase, CAT: catalase, GCS:  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase, GST: glutathione S-transferase,  $\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, GR: glutathione reductase, G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase.

$\mu$ L, 추출한 RNA(2  $\mu$ g)와 RNase free water로 11  $\mu$ L을 맞추고 65°C에서 6분간 반응시킨 후 5 $\times$ first-stand 완충용액 4  $\mu$ L, RNase-free water 1  $\mu$ L, DTT(100 mM) 2  $\mu$ L, SuperScript II Reverse Transcriptase 1  $\mu$ L를 섞어 9  $\mu$ L씩 각 PCR tube에 더한 후 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 반응시켰다. 실험에 사용한 primer sequence는 출판되어진 것을 사용하였고(21), Table 1에 나타내었다.

제조된 cDNA를 항산화 유전자 발현을 알아보기 위해 PCR을 실시하였다. GoTaq Green Master 10  $\mu$ L, 증류수 8  $\mu$ L, forward primer(15  $\mu$ M)와 reverse primer(15  $\mu$ M)을 각각 0.5  $\mu$ L, 그리고 합성한 first-stand cDNA 1  $\mu$ L을 PCR tube에 넣은 후 다음과 같은 조건으로 PCR을 하였다. SOD 1, SOD 2, GCS와 CAT는 95°C에서 5분, 95°C에서 30초, 52°C에서 40초, 72°C에서 40초, 72°C에서 10분이었고, GPx, GT, GR, G6PD 그리고 18S rRNA도 유사한 조건으로 PCR 하였으나, annealing 온도가 각각 60, 60, 62, 50 그리고 60°C로 달랐다. SOD 1, SOD 2, GCS, CAT, GPx, GT, GR, G6PD 그리고 18S의 PCR cycles은 각각 22, 23, 27, 22, 25, 35, 25, 21 그리고 15 cycles하였다. 18S를 내부 표준 유전자로 사용하였다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.2% agarose gel에 100V에서 30분간 전기영동 후 자외선광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 SigmaGel(Jandel Scientific) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

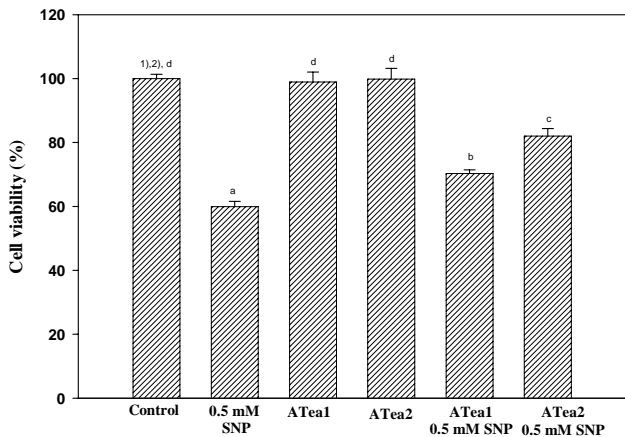
### 통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS(statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, USA) program을 이용하여 실험군당 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 각 농도의 평균치의 통계적 유의성을 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 잔대 에틸아세테이트 추출물의 세포내 산화적 스트레스 방어 효과

잔대 에틸아세테이트 추출물이 SNP에 의해 유발되어진 산화적 스트레스에 대하여 세포 사멸에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 0, 0.1, 0.5 그리고 1 mM의 SNP를 HepG2 세포에 처리하였을 때, 각각 100, 90.1, 59.9 그리고 20.5%의 생존율을 나타내었으므로, 산화적 스트레스를 유발시키기 위해서 0.5 mM의 SNP를 선택하였다. 잔대 에틸아세테이트 추출물의 세포내 산화적 스트레스 방어 효과를 알아보기 위하여 세포 독성을 유발하지 않는 50과 100  $\mu$ g/mL의 잔대 에틸아세테이트 추출물을 24시간 처리한 후 추출물을 첨가된 배지를 제거하고 이어서 0.5 mM의 SNP를 24시간 처리하였다. 50과 100  $\mu$ g/mL의 잔대 에틸아세테이트 추출물을 처리했을 때 세포 생존율은 각각 70.3% 및 82%로 SNP 단독 처리군과 비교하여 각각 10.4%와 22.1% 세포 생존율이



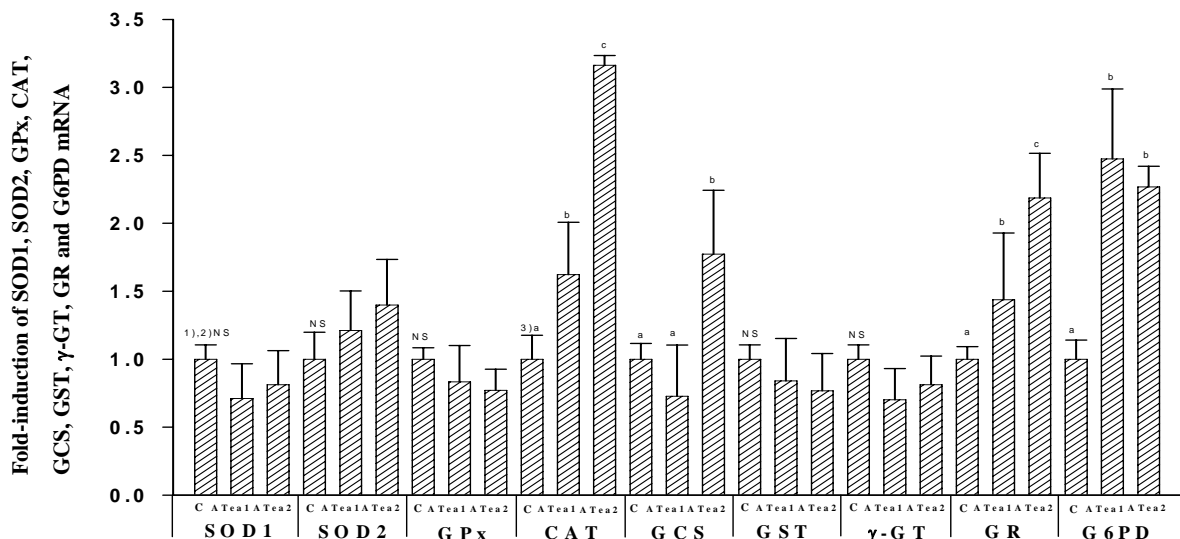
**Fig. 1. Effects of ATea (*Adenophora triphylla* ethylacetate extract) against SNP-induced cytotoxicity.** Cells were pre-incubated with medium alone (control) or medium containing ATea 1 (50 μg/mL) and 2 (100 μg/mL) for 24 hr. The medium was then replaced with medium alone or medium containing 0.5 mM sodium nitroprusside (SNP) and their viability assessed by a MTT assay. <sup>1)</sup>Results are from three experiments and are expressed as mean ± SD. <sup>2)</sup>Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

증가하였다(Fig. 1).

잔대와 도라지의 주요 생리활성물질은 사포닌인 것으로 알려져 있고(18), Choi 등(22)은 도라지 열수 추출물이 산화적 스트레스로부터 간세포를 보호한다고 보고하였는데, 이는 세포내 free radical을 이들 추출물이 제거함으로써 인체에 해독작용을 담당하는 조직인 간을 보호한다고 하였다. Chung 등(23)은 잘 알려져 있는 항산화제인 caffeic acid와 Trolox

로 세포에 전처리 후 SNP로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 이들 항산화제가 산화적 스트레스에 대하여 세포 생존율을 높일 수 있다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보여주었다.

잔대 에틸아세테이트 추출물의 항산화 유전자 발현 효과  
잔대 에틸아세테이트 추출물이 세포내 항산화 방어시스템인 4개의 주요 효소들(SOD 1, SOD 2, GPx와 CAT) 및 glutathione 대사에 관여하는 효소들(GR, GCS, GST, γ-GT와 G6PD)의 mRNA 발현에 미치는 영향력을 Fig. 2에 나타내었다. HepG2 세포에 잔대 에틸아세테이트 추출물 처리하여 24시간 배양하였고, 이때 처리 농도는 세포독성을 유발시키지 않는 농도인 50과 100 μg/mL이었으며, 시료를 처리하지 않은 무처리군을 대조군으로 하였다. 내부 표준 유전자로 18S를 사용하여 각 항산화 유전자 mRNA에 대해 보정한 후 대조군이 1배일 때 처리군이 몇 배 증가했는지 나타내었다. 50과 100 μg/mL 잔대 에틸아세테이트 추출물을 24시간 동안 HepG2 세포에 처리하였을 때 항산화 방어시스템인 4개의 주요 효소들인 SOD 1, SOD 2, GPx 및 CAT의 mRNA 수준이 50 μg/mL 처리군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 변화지 않았으나, 100 μg/mL 처리군에서는 CAT가 유의적으로 증가하였다(Fig. 2). CAT의 mRNA 발현은 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 증가하였으며, 100 μg/mL 처리군에서 3.2배 증가하였다(Fig. 2). Glutathione 대사에 관여하는 5개의 주요 효소들(GR, GCS, GST, γ-GT와 G6PD) 중 50 μg/mL 처리군은 시료를 처리하지 않은 대



**Fig. 2. Effect of ATea (*Adenophora triphylla* ethylacetate extract) on the expression of SOD 1, SOD 2, GPx, CAT, GCS, GST, γ-GT, GR and G6PD mRNA.** Cells were incubated with medium alone (C, control) or medium containing ATea 1 (50 μg/mL) and 2 (100 μg/mL) for 24 hr. <sup>1)</sup>Results are from three experiments and are expressed as mean ± SD. <sup>2)</sup>NS: not significantly (p<0.05) by Duncan's multiple range test. <sup>3)</sup>Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. The SOD 1, SOD 2, GPx, CAT, GCS, GST, γ-GT, GR and G6PD mRNA levels in each sample was normalized to the quantity of 18S rRNA (18S). The fold-induction of SOD 1, SOD 2, GPx, CAT, GCS, GST, γ-GT, GR and G6PD mRNA in treated cells was calculated as ratio of corresponding mean value of the control cells.

조군과 비교하여 G6PD mRNA 수준만 현저히 증가하였으나, 고농도 처리군에서는 GCS, GR 그리고 G6PD mRNA 수준이 현저히 증가하였다(Fig. 2). GR의 mRNA 수준은 농도 의존적으로 증가하였고, 고농도에서는 대조군과 비교하여 2.2배 증가하였다. G6PD의 mRNA 수준은 농도 간에 차이는 보이지 않았고, 대조군과 비교해서 2.4배 증가하였다.

Shin과 Ihm(7)은 *in vivo* 당뇨 실험에서 마늘의 S-allyl-cysteine를 섭취하게 하였을 때 SOD, CAT, GPx, GR의 mRNA 수준이 증가한다고 보고하였으며, G6PD는 NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 형성에서 환원력을 공급하는데 필수적인 요소로 알려져 있다(20). Chung 등(20,23,24)의 보고에 의하면 세포에 항산화 물질인 caffeic acid, genistin 및 아연을 처리하였을 때 G6PD mRNA 수준이 대조군에 비하여 현저히 증가하였는데 이들 항산화 유전자의 증가가 산화적 스트레스로부터 세포를 보호한다고 하였다.

본 실험에서 CAT, GCS, GR 그리고 G6PD mRNA 수준이 잔대 에틸아세테이트 추출물 처리 후 증가하였으나, SOD 1, SOD 2, GPx, GST 그리고  $\gamma$ -GT mRNA 수준은 변화하지 않았다. 따라서 잔대 에틸아세테이트 추출물이 CAT, GCS, GR 그리고 G6PD 유전자 발현을 증가시키므로 간접적 항산화 효과가 있고, 이들 항산화 효과에 의해 산화적 스트레스로부터 세포를 보호해 줄 것으로 추정된다.

페놀 화합물은 식물계에서 널리 분포되어 있고, 플라보이노이드와 탄닌의 주성분이다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 대표적인 free radical scavenger로 알려져 있고(24), Chung 등(23)은 caffeic acid를 세포에 처리하였을 때 농도 의존적으로 항산화 유전자 발현을 증가시켰다고 하였다. 이들 보고들은 페놀 화합물이 직접적 또는/그리고 간접적으로 항산화 효과를 가지고 있다는 것을 보여 주었다.

모든 결과를 종합해 보면 잔대 에틸아세테이트 추출물은 세포내 방어 시스템을 증가시켜 항산화 작용을 나타내므로 다양한 분야에 기능성 소재로 활용가능성을 제시하고 있다. 앞으로 이 잔대 에틸아세테이트 추출물의 기능성 물질 분석 및 *in vivo*에서도 유사한 결과를 얻을 수 있는지에 대한 연구들이 수행되어야 할 것이다.

## 요 약

잔대 뿌리는 우리나라에서 예로부터 민간약으로 이용되어 오고 있다. 본 연구에서는 인간 간세포인 HepG2에 잔대 뿌리의 에틸아세테이트 추출물을 처리했을 때 sodium nitroprusside(SNP)에 의해 유도된 세포 독성 및 항산화 유전자 발현에 미치는 영향력을 알아보았다. 먼저, 잔대 에틸아세테이트 추출물이 NO에 의해 유도된 세포 사멸을 저해할 수 있는지를 알아보기 위하여 HepG2 세포에 잔대 에틸아세

테이트 추출물(각각 50과 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 24시간 먼저 처리한 후 세포내에서 NO를 생성시킬 수 있는 0.5 mM SNP를 처리하였다. NO에 의한 세포독성이 에틸아세테이트 추출물에 의해 저해되었다는 것을 mitochondrial dehydrogenase 활성을 알아보는 MTT assay를 실시하여 알아보았다. 더하여 우리는 잔대 에틸아세테이트 추출물이 세포내 항산화 방어 시스템인 Cu,Zn superoxide dismutase(SOD 1), Mn SOD(SOD 2), glutathione peroxidase(GPx), catalase와 glutathione metabolism과 관련되어져 있는 glutathione reductase(GR),  $\gamma$ -glutamyl-cystein synthetase(GCS), glutathione-S-transferase(GST),  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase( $\gamma$ -GT), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 알아보았다. CAT, GCS 그리고 G6PD mRNA 수준이 잔대 에틸아세테이트 추출물 처리 후 증가하였으나, SOD 1, SOD 2, GPx, GST 그리고  $\gamma$ -GT mRNA 수준은 변화하지 않았다. 따라서 잔대 에틸아세테이트 추출물이 간접적 항산화 효과가 있고, 이들 효과는 아마 CAT, GCS, GR 그리고 G6PD 유전자 발현 증가에 의한 것이라고 추정되었다.

## 감사의 글

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

## 문 헌

- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6858-6862.
- Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B. 1991. Oxygen free radicals and human diseases. *R Soc Health* 111: 172-177.
- Videla LA, Fernandez V. 1988. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp* 21: 86-92.
- Halliwell B, Aruoma OJ. 1991. DNA damage by oxygen derived species. *FEBS Lett* 281: 9-19.
- Ames BA. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264.
- Fridorich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biophys* 247: 1-11.
- Shin CH, Ihm J. 2008. Effect of S-allylcysteine on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat. *J Korean Endocr Soc* 23: 129-136.
- Frei B. 1999. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *FASEB J* 13: 963-964.
- Kang Y, Chen Y, Yu A, Voss-McCowan M, Epstein P. 1997. Over expression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses dextrorubicin cardiotoxicity. *J Clin Invest* 100: 1501-1506.
- Vasak M, Hasler DW. 2000. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol* 4: 177-183.

11. Eriksso CJ, Na A. 1996. Antioxidant agents in raw materials and processed foods. *Biochem Soc Symp* 61: 221-234.
12. Silveria ER, Moreno FS. 1998. Natural retinoids and  $\beta$ -carotene: from food to their actions on gene expression. *J Nutr Biochem* 9: 446-456.
13. Pitchumoni SS, Doraiswamy PM. 1998. Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 46: 1566-1572.
14. Vatassery GT. 1998. Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. *Geriatrics* 53: S25-S27.
15. 이영은, 홍승현. 2004. 한방식품재료학. 교문사, 서울. p 161-162.
16. 윤국병, 장준근. 1989. 몸에 좋은 산야초. 석오출판사, 서울. p 311.
17. Gum SI, Lee DU, Cho MK. 2007. Protective effects of water extracts composed of *Adenophora triphylla* var. *japonica* Hera on the acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Korean J Food Sci Technol* 39: 688-693.
18. Cho JT. 1985. Physiological and ecological studies on the Chinese bellflower, *Platycodon grandiflorum* DC. *J Kor Soc Hort Sci* 26: 22-28.
19. Baek SE, Woo SK, Kim MU. 1991. Studies on the chemical composition of Sa-sam. *Kor Life Sci* 9: 103-115.
20. Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. 2005. ZINC-mediated gene expression offers protection against  $H_2O_2$ -induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 205: 225-236.
21. Schmidt AJ, Heiser D, Hemmeter UM, Krieg JC, Vedder H. 2008. Effect of antidepressants on mRNA levels of antioxidant enzyme in human monocytic U-937 cells. *Prog Neuro-Psychoph* 32: 1567-1573.
22. Choi CY, Lee KJ, Jeong HG. 2002. Effects of aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* against t-butyl hydroperoxide induced oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Yakhok Hoeji* 46: 466-471.
23. Chung MJ, Walker PA, Hogstrand C. 2006. Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and Trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. *Aquat Toxicol* 80: 321-328.
24. Chung MJ, Kang AY, Lee KM, Oh E, Jun HJ, Kim SY, Auh JH, Moon TW, Lee SJ, Park KH. 2006. Water-soluble genistin glycoside isoflavones up-regulate antioxidant metallothionein in expression and scavenge free radicals. *J Agric Food Chem* 54: 3819-3826.
24. Higasi GS. 2000. Appraisalment of antioxidative activity from vegetables. *Japan J Food Ind* 57: 56-64.

(2008년 8월 28일 접수; 2008년 9월 23일 채택)