

Antioxidant Effect of Hederagenin 3-O-b-D-Glucopyranosyl(1→3)-a-L-Rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-Arabinopyranoside (HDL) Isolated from Root Bark of *Ulmus davidiana*

Jin-Gu Bong and Yoon-yub Park^{1*}

Department of Surgery, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

¹Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

Received January 7, 2010 / Accepted January 15, 2010

We investigated the antioxidant effects of hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside (HDL) isolated from root bark of *Ulmus davidiana* on the activity of enzymes related to reactive oxygen species (ROS) in human osteosarcoma U2OS cells. Cobalt chloride (CoCl₂), a transition metal, was used as an inducer of oxidative stress, generating hydrogen peroxide (H₂O₂) via increasing xanthine oxidase (XO) activity. The increased levels of H₂O₂, XO, ferritin, and ferritin iron by CoCl₂ were diminished effectively by co-treatment with HDL in U2OS cells. Furthermore, decreased levels of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) by CoCl₂ were highly increased by co-treatment with HDL in U2OS cells; however, the levels of glutathione peroxidase (GPx) did not change. The increased contents of TBARS related to lipid peroxidation were significantly reduced by HDL in U2OS cells. The concentration of GSH changed in a pattern that went against regulated TBARS by CoCl₂ and HDL. We examined the expression of p53, p21^{CIP1/WAF1}, and p27^{KIP1} proteins related to oxidative stress and cell cycle regulation. As a result, the expression of p27^{KIP1} modulated by CoCl₂ was not changed by HDL. However, the expression of p53 and p21^{CIP1/WAF1} increased by CoCl₂ was reduced by HDL in U2OS cells. Together with alteration of p53 and p21^{CIP1/WAF1} proteins, the accumulated cells at G1 phase by CoCl₂ was decreased by HDL in U2OS cells. Our data suggests that HDL inhibits CoCl₂-generated ROS in U2OS cells, providing potentially new antioxidant compounds that are isolated from natural products.

Key words : Hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside (HDL), *Ulmus davidiana*, reactive oxygen species (ROS), antioxidant, cell cycle

서 론

유근피(root bark of *Ulmus davidiana*)는 느릅나무(*Ulmus davidiana*)의 뿌리껍질로서 인체에 독성이 없고 다양한 생리활성을 지니고 있다고 동의보감 등에 보고되어 있다[20,28]. 또한 유근피는 한방에서 부은 것을 가라앉히고 불면증, 위궤양, 위염, 위하수 등 각종 위장 질환에 치료효과가 있다는 것으로 알려져 있다. 느릅나무의 줄기껍질인 유피나 뿌리의 껍질인 유근피에는 다양한 생리활성 물질이 다량 포함되어 있는 것으로 알려져 있는데, 유근피에서 분리된 화합물로는 flavonoid 인 (+)-catechin과 그 배당체인 (+)-catechin-5-O-β-D-apiofuranoside 등이 보고되어 있다[45]. Polyphenol계 화합물인 catechin은 유근피뿐만 아니라 생리활성을 갖는 다양한 천연물에서 분리되어 암의 성장을 억제하는 항암 효과와[10] 산화적 스트레스를 억제하는 항산화 효과를 갖는 것으로 잘 알려져 있다[32]. 또한 유피에서는 friedelin, epifriedelin, taraxerol 등 3종의 triterpenoid가 보고되어 있으며[19], 유근피에서 이러한

화합물 외에도 당단백질(glycoprotein)이 분리되어 암세포의 성장과 암의 전이에 관여하는 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)의 활성 및[46] 세포사멸(apoptosis)을 억제하는 것으로 알려져 있다[29].

최근 다양한 질병과 노화를 야기하는 자유라디칼(free radical)을 제거하는 항산화제 개발의 연구가 대두되고 있다. 특히 구조가 밝혀지지 않은 다량의 생리활성 물질을 포함하는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되면서, 이 천연물로부터 생리활성을 갖는 화합물들을 분리하고 화합물의 구조를 밝히는 연구도 병행되고 있다[12,30,35]. 최근 유근피에서 분리된 화합물의 구조를 밝히고, 이 화합물들을 이용하여 각종 질병에 대한 실험 및 치료의 연구가 활발하게 진행되고 있다[21,24,26]. 그러나 유근피에서 분리된 화합물이 어떠한 메커니즘을 통하여 치료효과를 갖는지에 대한 연구는 수행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성 효과를 가진 유근피로부터 분리한 hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside (HDL)을 이용하여 항산화 기전을 중심으로 한 연구를 수행하였으며, 연구의 결과를 바탕으로 독성이 없는 천연 항산화제에 대한 가능성을 살펴보고자 한다.

*Corresponding author

Tel : +82-53-650-4475, Fax : +82-53-621-4106

E-mail : yypark@cu.ac.kr

재료 및 방법

세포배양

인간 골육종암(human osteosarcoma) U2OS 세포는 American type culture collection (MD, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. U2OS 세포는 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% 항생제(antibiotic-antimycotic)가 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)-high glucose 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포는 1×10⁵ cells/ml의 농도를 유지하여, 2~3일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 배양에 사용된 우태혈청, 항생제, 그리고 DMEM-high glucose 배지는 모두 Gibco-BRL (NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

재료 및 시약

실험에 사용한 hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside (HDL) (Fig. 1A)의 구조는 Kalinovskii [23]의 ¹³C NMR 데이터를 기준으로 결정하였으며, HPLC 분석을 통해 99.5% 이상의 순도를 확인하였다. 분리된 HDL은 영남대학교의 장현욱 교수로부터 제공받아 실험에 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-[4,5-dim-enthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltera-zolium bromide, xanthine, phenylmethylsulfonyl fluoride, dithiothreitol, xanthine, KCl, DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), HEPES, standard horse ferritin, α-chloronaphthol, hydroquinone, o-phenanthroline, ferrous sulfate, perchloric, 2-vinylpyridine, yeast glutathione reductase, 5,5' dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), NADPH, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, propidium iodide, NP-40, RNase A 등의 시약은 Sigma chemical Co. (MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 기타시약은 분석용 고순도 특급 시약을 사용하였다.

세포증식 억제조사

96 well tissue culture plate (Falcon, USA)에 U2OS 세포를 1×10⁵ cells/ml의 농도로 각 well 당 100 μl씩 분주하여, 24시간 동안 배양 후 실험에 사용하였다. U2OS 세포에 CoCl₂ 및 HDL을 단독 혹은 함께 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 12시간 또는 24시간 후 약물이 포함되어 있는 배양액에 MTT reagent (3-[4,5-dim-enthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltera-zolium bromide)를 처리하여 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 후 MTT reagent가 혼합되어 있는 배양액을 제거하고 DMSO를 처리하여 마이크로플레이트리더기(VICTORTM×3 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer Life Sciences, USA)로 540 nm의 파장 하에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 나타내었다.

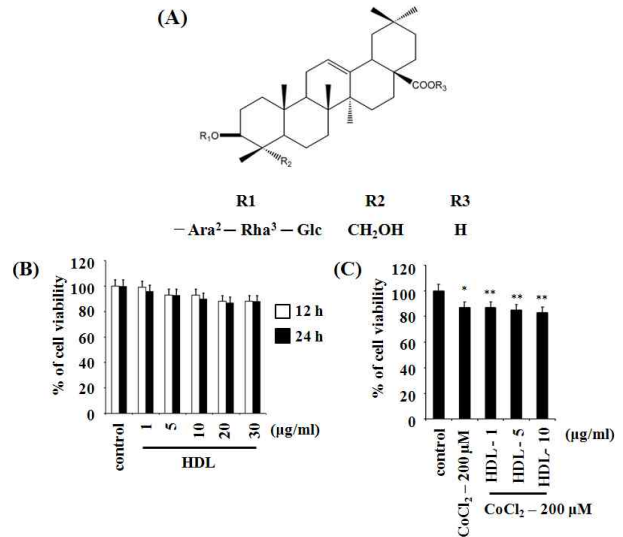


Fig. 1. Chemical structure of hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside (HDL) isolated from root bark of *Ulmus davidiana* and the effect of HDL on the cell viability of human osteosarcoma U2OS cells. (A) Chemical structure of hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)- a-L-arabinopyranoside (HDL). (B) Dose-dependent effect of HDL on the cell viability of U2OS cells. U2OS cells were treated with the compounds for 12 hr and 24 hr in media containing 10% serum and viability was determined by MTT assay. (C) The combined effect of CoCl₂ and HDL on the cell viability of U2OS cells. Values represent the mean of at least three independent experiments; bars, S.D. Results were statistically significant (*, *p*<0.05 compared with control; **, *p*<0.01 compared with CoCl₂ only treatment) using Student's *t* test.

Hydrogen peroxide 생성 측정

U2OS 세포를 6-well plate에 4×10⁴ cells/well 밀도로 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. U2OS 세포에 CoCl₂를 단독 혹은 HDL과 함께 처리한 후, DCFH-DA를 10 μM 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 1시간 반응시켰다. 세포를 ice-cold PBS로 3회 수세 후, lysis buffer (protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Germany) 1 tablet/50 ml TNES buffer (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl))를 100 μl씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay system (Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 수행되었다. 동일한 양의 단백질을 마이크로플레이트리더기를 이용하여, emission 535 nm, excitation 485 nm의 파장에서 형광측정 하였다.

Xanthine oxidase 활성 측정

Xanthine oxidase의 활성도를 측정하기 위해 cell lysate를

Zweier [50]의 방법에 따라 준비하였다. 요산(uric acid)의 생성은 Zweier [50]의 방법에 따라 60 $\mu\text{mol/l}$ 의 xanthine을 cell lysate에 첨가하여 흡광도 290 nm하에서 마이크로플레이트리더기로 측정하였다. 효소활성은 단백질 1 mg에 대해 1 unit으로 나타내었으며, 이때 1 unit은 1분 동안 요산으로 환원되는 기질의 1 μmol 과 동일하게 표시하였다.

Antioxidant enzyme 활성 측정

항산화효소인 catalase를 측정하기 위해 KCl (140 mM)이 포함되어 있는 칼륨인산염 완충액(potassium phosphate buffer, 25 mM, pH 7.4)을 cell lysate에 첨가하여 600 \times g의 속도로 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 Aebi [1]의 방법에 따라 catalase를 측정하는데 사용하였다. 흡광도 240 nm에서 감소되는 hydrogen peroxide (H_2O_2)의 초기 가상 계수반응상수(pseudofirst order reaction constant, $k' = k [\text{CAT}]$)를 정하였고 1 μg 의 단백질에 대한 1 pmol 농도의 catalase 활성을 $k = 4.7 \times 10^7 / \text{Ms}$ 의 상수를 이용하여 계산하였다. Glutathione peroxidase (GPx)와 Superoxide dismutase (SOD)를 측정하기 위해 600 g의 속도로 10분간 원심분리한 상등액을 9,000 \times g의 속도로 10분간 다시 원심분리하였다. GPx와 SOD를 측정하기 위해 BIOXYTECH[®] GPx-340[™] (OXIS International)과 BIOXYTECH[®] SOD-525[™] (OXIS International) kit를 각각 사용하여 제조사의 사용설명서에 따라 실험을 수행하였다. BIOXYTECH[®] SOD-525[™]의 경우 Mn-SOD를 비활성화시키기 때문에 에탄올-클로로포름 추출이 권장되었으며, Cu-Zn-SOD에 특이적으로 반응한다.

Ferritin 함량 측정

세포 내 ferritin 함량을 측정하기 위해 KCl (10 mmol/l)과 DTT (dithiothreitol, 0.5 mmol/l)가 포함되어 있는 냉각된 HEPES (10 mmol/l, pH 7.9) 용액에 1 mg의 cell lysate를 준비한 후, cell lysate를 10,000 \times g의 속도로 5분간 원심분리 하였다. ferritin의 정량을 위해 말의 표준 ferritin (standard horse ferritin)을 이용하여 Tris-Na 용액에 0.25~15 ng/50 μl 의 농도로 희석하였고, Roskams와 Connors [43]의 방법에 따라 진공도트 블롯(vacuum dot blot)을 이용하여 Tris-Na 용액에 미리 담가둔 nitrocellulose membranes (MSI, Westboro, MA, USA)에 cell lysate (Tris-Na 용액에 단백질을 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 희석)를 각 샘플마다 3개 씩 흡착시켰다. 탈지분유(Skim milk, 3 g/l)가 포함된 Tris-Na 용액을 이용하여 nitrocellulose membrane을 상온에서 1 시간 동안 블로킹(blocking)을 한 후, Tris-Na 용액에 5분간 3회 세척하였다. ferritin 1차 항체(rabbit anti-horse ferritin)가 포함된 Tris-Na 용액에 nitrocellulose membrane을 4°C에서 12시간 이상 교반기에서 반응시켰다. 1차 항체를 반응시킨 nitrocellulose membrane을 Tris-Na 용액에 5분간 3회 세척하고, 상온에서 2차 항체(peroxidase con-

jugated, goat anti-rabbit immunoglobulins)를 1시간 동안 반응시킨 후 Tris-Na 용액에 5분간 3회 세척하였다. 메탄올과 H_2O_2 가 포함된 α -chloronaphthol 용액을 반응시켜 현상하였다. 블롯에 현상된 도트는 농도계(densitometer) 프로그램 (Gel-Pro analyzer 3.1 version, Media Cybernetics)을 이용하여 정량 하였다.

Ferritin iron 농도 측정

세포 내 ferritin iron의 농도를 측정하기 위해 ferritin 함량 측정과 동일한 방법으로 cell lysate를 준비하였다. 준비된 cell lysate를 70°C에서 10분간 반응 후 15,000 \times g의 속도로 15분간 원심분리하여 -20°C에 보관하였다. 세포 내 ferritin을 추출하기 위해 염산(HCl, 2.8 mol/l)에 90°C에서 1시간 동안 가수분해하였다. 가수분해 후 침전된 단백질은 15,000 \times g의 속도로 15분간 원심분리하여 제거하였다. 단백질이 제거된 상등액 1 ml을 20 μl 의 hydroquinone (20 g/l)과 20 μl 의 o-phenanthroline (10 g/l)에 반응시킨 후 505 nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더기로 측정하였다. Ferritin iron의 정량을 위해 ferrous sulfate (pH 3.0) 표준 용액의 흡광도를 기준으로 표준곡선을 만들어 사용하였다. ferrous sulfate 표준 용액 또한 cell lysate를 준비하는 과정과 동일하게 염산으로 가수분해하였다.

Glutathione (GSH) 함량 측정

세포 내 전체의 GSH 및 oxidized glutathione (GSSG)은 cell lysate를 perchloric (20 $\mu\text{l}/\text{ml}$)로 침전시킨 후, yeast glutathione reductase, 5,5' dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) 그리고 NADPH를 이용하여 흡광도 290 nm 하에서 마이크로플레이트리더기로 측정하였다. GSSG은 2-vinylpyridine를 이용하여 GSH와 동일한 방법으로 측정하였다. GSH의 함량은 전체의 GSH 및 GSSH의 값과 GSSG의 차이 값으로 계산하였다[2].

Lipid peroxidation 측정

세포 내 지질 과산화효소(lipid peroxidation)는 MDA (malondialdehyde)로 대표되는 thiobarbituric acid와 반응하는 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)의 생성 비율을 이용하여 측정하였다[5]. Cell lysate에 대해 0.5 부피의 TCA (trichloroacetic acid, 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 첨가하여 2,000 \times g의 속도로 10분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액에 0.5 부피의 thiobarbituric acid (0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 혼합하여 95°C에 10분간 반응시켰다. 샘플을 냉각한 후, 535 nm 하에서 마이크로플레이트리더기로 측정하였다. MDA의 농도는 상수 ϵ ($1.56 \times 10^5 \text{ mol/l} \cdot \text{cm}$)를 사용하여 계산하였다.

Western blot 분석

U2OS 세포를 6-well plate에 1×10^6 cells/well 밀도로 세포를 분주하여 37°C, 5% CO_2 세포 배양기에서 배양하였다. 안정

화된 U2OS 세포에 CoCl_2 를 단독 혹은 HDL과 함께 처리하였다. 세포를 ice-cold PBS로 3회 수세 후, lysis buffer (protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Germany) 1 tablet/50 ml TNES buffer (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl))를 100 μl 씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4°C , 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay system (Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 수행되었다. cell lysate (30 $\mu\text{g}/\text{lane}$)를 10% SDS-PAGE로 전기영동 한 후 Immobilon-p-membrane (Millipore, USA)으로 트랜스퍼 시켰다. Membrane은 anti-p53, anti-p21, anti-p27, β -actin 1차 항체(Santa Cruz, CA, USA)와 4°C 에서 12시간 이상 교반기에서 반응하였다. 1차 항체를 반응시킨 Immobilon-p-membrane을 TBS-T 용액에 10분간 3회 세척하고, 상온에서 2차 항체 (peroxidase conjugated, goat anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulins, Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA)를 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T 용액에 10분간 3회 세척하였다. 블롯은 ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 현상하였다.

세포주기 분석

U2OS 세포를 6-well plate에 1×10^6 cells/well 밀도로 세포를 분주하여 37°C , 5% CO_2 세포 배양기에서 배양하였다. 안정화된 U2OS 세포에 CoCl_2 를 단독 혹은 HDL과 함께 처리하였다. 24시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 냉각된 80% 에탄올을 이용하여 24시간 동안 고정하였다. 세포 주기를 측정하기 위해 DNA를 PI (50 μg propidium iodide, 0.1 % NP-40, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A) 용액에 4°C 에서 30분 동안 암실에서 염색하였다. 세포의 주기는 FACS Calibur flow cytometry (Beckman coulter)를 이용하여 측정하였으며, Expo 32 ADC XL 4 color 프로그램을 이용하여 분석하였다(PI detect : excitation 488 nm, emission 585 nm).

통계 분석

대조군과 양성대조군 혹은 양성대조군과 실험군 사이의 통계적인 유의성 검증은 Student's t-test로 양측 검증을 시행하여 p 값이 0.05 미만일 때와 0.01 미만일 때를 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다.

결 과

골육종암 세포에서 세포증식에 대한 HDL의 영향

U2OS 세포에 10% FBS를 함유한 배지에 HDL을 1, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 12시간 혹은 24시간 동안 처리하여, 세포생존율을 MTT assay법을 이용하여 백분율로 나타내었다. HDL을 고농도인 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 12시간 혹은 24시간

처리하였을 경우 U2OS 세포는 모두 80% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 1B). 이러한 연구결과 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도에서도 HDL이 U2OS 세포의 생존율에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

세포 내 ROS를 생성하는 것으로 알려진 전이금속인 CoCl_2 에 대한 HDL의 항산화 효과를 측정하기 위해 U2OS 세포에 CoCl_2 와 HDL을 함께 처리하여 MTT assay 방법으로 세포의 생존율을 측정하였다. U2OS 세포에 200 μM 의 CoCl_2 와 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 HDL 단독 혹은 함께 12시간 동안 처리한 결과, CoCl_2 를 단독으로 처리한 경우 80% 이상의 생존율을 나타내었고, CoCl_2 와 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 HDL을 함께 처리한 경우 또한 80% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 1C). 세포생존율에 대한 실험결과 U2OS 세포에 CoCl_2 와 HDL을 함께 처리하더라도 세포의 생존율에는 영향을 미치지 않는다는 사실을 확인하였다.

HDL의 hydrogen peroxide 생성 저해 효과

전이금속인 CoCl_2 는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 GSH의 수준을 감소시키고, GSSG의 수준을 증가시키며 오탄당인산회로(pentose phosphate pathway)의 활성을 조절하여 ROS를 생성하는 것으로 알려져 있다[14]. U2OS 세포에서 H_2O_2 의 생성을 조사하기 위해 세포막 투과성이 있는 DCF-DA dye를 사용하여 H_2O_2 의 생성 정도를 측정하였다. 형광을 띠지 않는 DCF-DA dye는 세포 내에서 DCF로 가수분해가 되며, 이 가수분해가 된 DCF-DA dye는 세포내의 H_2O_2 와 반응하여 높은 형광을 띠게 된다. 따라서 DCF-DA dye에 의한 형광의 정도는 세포 내에 생성된 H_2O_2 의 양과 비례한다. CoCl_2 를 200 μM 농도의 CoCl_2 를 12시간 동안 처리시 control에 비하여 약 2.3배의 H_2O_2 가 증가하였으며, CoCl_2 와 HDL을 함께 처리하였을 경우 H_2O_2 의 생성은 HDL의 농도 의존적으로 감소하였다. CoCl_2 처리에 의해 생성이 증가된 H_2O_2 는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 HDL에 의해 1.2배로 감소하였다(Fig. 2A). 이러한 연구결과 HDL이 CoCl_2 에 의한 H_2O_2 의 생성을 저해하는 항산화 효과를 확인하였다.

HDL의 xanthine oxidase (XO) 활성 저해 효과

미토콘드리아의 전자전달계, NADPH 산화효소 복합체(NADPH oxidase complex), 그리고 XO 등은 ROS의 생성 조절기전에 관여하는 것으로 보고되고 있다[6]. 이 중 XO는 생체 내 퓨린대사에 관여하는 효소로써 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 요산을 형성한다. 또한 CoCl_2 는 XO의 활성을 증가시키고 일산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)를 저해하는 것으로 알려져 있다[47]. 이러한 보고를 바탕으로 U2OS 세포에 CoCl_2 를 처리하여 XO의 활성을 증가시킨 후, 증가한 XO의 활성에 대해 HDL의 저해효과를 확인하였다. U2OS 세포에 CoCl_2 와 HDL을 6시간 동안 함께 처리하여

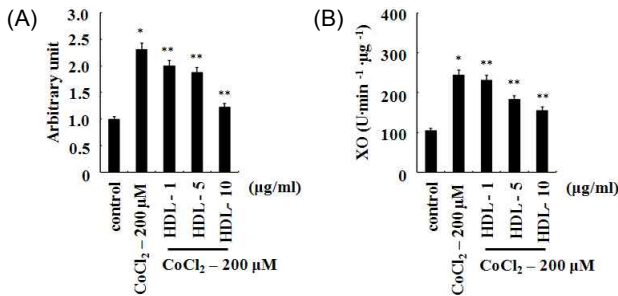


Fig. 2. The combined effect of CoCl_2 and HDL on hydrogen peroxide (H_2O_2) and xanthine oxidase (XO) activity in U2OS cells. (A) U2OS cells were treated with various concentrations of HDL in the presence of CoCl_2 200 μM for 12 hr. The concentration of H_2O_2 was determined by the DCF-DA methods as described in materials and methods. (B) Lysates of untreated cultures of U2OS cells or those exposed to CoCl_2 200 μM for 12 hr were used to measure XO activity in the presence of different concentrations of HDL. Values represent the mean of at least three independent experiments; *bars*, S.D. Results were statistically significant (*, $p < 0.05$ compared with control; **, $p < 0.01$ compared with CoCl_2 only treatment) using Student's *t* test.

XO의 활성을 측정된 결과 CoCl_2 에 의해 활성이 증가되었던 XO가 HDL에 의해 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2B). U2OS 세포에 200 μM 농도의 CoCl_2 를 처리하였을 경우 245 ± 11 units/mg의 활성을 나타내었던 XO가 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 HDL에 의해 156 ± 8 units/mg으로 활성이 감소하였다 (Fig. 2B). 이상의 결과 HDL의 항산화 효과는 CoCl_2 에 의해 생성된 XO의 활성 저해를 통해서임을 알 수 있었다.

HDL의 antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx) 활성에 대한 효과

Free radical로부터 세포를 보호하는 항산화 효소로서 SOD,

catalase (CAT), 과산화효소 및 GPx 등 내인성 항산화 효소가 알려져 있으며[9,34,40], 또한 glutathione, 토코페롤 등의 항산화 물질은 세포 내에서 생성되는 free radical을 제거하는 ROS scavenger로 알려져 있다[27]. HDL이 항산화 효소의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 U2OS 세포에 CoCl_2 및 HDL을 처리하여 SOD, CAT, 그리고 GPx 각각에 대한 효소 활성을 측정하였다.

H_2O_2 등의 ROS를 제거하여 세포의 항상성을 유지하는 CAT는 H_2O_2 를 $2\text{H}_2\text{O}$ 와 O_2 로 가수분해하는 효소로 알려져 있다. U2OS 세포에 CoCl_2 에 의해 생성이 증가되었던 H_2O_2 가 HDL에 의해 감소하였는데, 이 과정에서 CAT의 활성이 조절되었는지를 Aebi [1]의 방법에 따라 측정하였다. CAT의 활성은 1초당 단백질 1 mg에 대해 분해되는 H_2O_2 의 양을 pmole 단위로 표기하였다. U2OS 세포에 200 μM 농도의 CoCl_2 와 HDL을 농도 별로 12시간 동안 함께 처리한 결과 HDL의 농도 의존적으로 CAT의 활성이 증가하였으며, CoCl_2 에 의해 35% 감소되었던 CAT의 활성이 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 HDL에 의해 12%의 감소율을 보였다. 이 결과는 CoCl_2 에 의해 감소된 CAT의 활성이 HDL에 의해 증가하여 H_2O_2 의 가수분해를 촉진하는 것으로 사료된다(Table 1).

GPx는 GSH를 산화된 GSH인 GSSG로 전환하는 효소이다. 그리고 NADPH를 산화하여 NADP^+ 로 전환시키는 glutathione reductase (GR)에 의해 GSSG는 GSH로 환원된다. 세포는 이러한 산화와 환원의 순환과정을 끊임없이 반복하며 항상성을 유지하게 된다. GSH가 GSSG로 전환되는 과정에서 CAT와 함께 GPx는 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 가수분해하게 된다. 세포는 항상성 유지를 위해 CoCl_2 에 의해 생성된 H_2O_2 를 제거하기 위해 GSH를 GSSG로 전환하는데 이 과정에서 세포는 GPx의 활성을 높게 된다. U2OS 세포에 CoCl_2 및 HDL을 12시간 동안 처리한 후 BIOXYTECH® GPx-340™ kit를 사용하여 GPx

Table 1. Effects of hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)- a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside (HDL) on oxidative stress defensive enzymes in U2OS cells

	GPx (U/ μg)	CAT (U/ μg)	SOD (pmole/ μg)
Con	343.56±7.5	2.6±0.1	97.3±4.5
CoCl_2 - 200 μM	335.11±6.8	1.7±0.1	66.9±6.6
CoCl_2 + HDL-1 $\mu\text{g/ml}$	344.21±4.4	1.7±0.1	65.3±4.3
CoCl_2 + HDL-5 $\mu\text{g/ml}$	348.66±5.7	2.0±0.1	76.3±3.3
CoCl_2 + HDL-10 $\mu\text{g/ml}$	355.59±6.4*	2.3±0.1*	89.7±5.7*
HDL-10 $\mu\text{g/ml}$	352.81±4.1	2.5±0.1	95.5±5.8

U2OS cells were treated with CoCl_2 200 μM alone or combined with HDL. GPx activity was expressed as $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ protein. One unit GPx represents the oxidation of 1 μmol NADPH/min under the assay conditions. SOD activity was expressed as U/ μg protein. SOD activity was measured according to the Bioxytech SOD-525 method based on the SOD-mediated increase in the rate of autooxidation of 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo[c]fluorine in aqueous alkaline solution to yield a chromophore with maximum absorbance at 525 nm. The SOD activity was determined from the ratio of the autooxidation rates in the presence (V_s) and in the absence (V_c) of SOD. One SOD-525 activity unit is defined as the activity that doubles the autooxidation rate of the control blank ($V_s/V_c = 2$). CAT activity was expressed as pmole H_2O_2 decomposed per second per μg protein under the assay conditions. * Significantly different from concurrent control at $p < 0.05$.

를 측정하였으며, GPx는 1분 동안 1 mmol의 NADPH가 산화되는 값으로 나타내었다. 200 μM 농도의 CoCl₂를 처리하였을 경우 control에 비하여 GPx의 활성은 3.5% 감소하였으며 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 그리고 200 μM 농도의 CoCl₂와 HDL을 농도 별로 12시간 동안 함께 처리한 경우 HDL의 GPx에 대한 활성은 변화를 보이지 않았다. 이 결과는 CoCl₂와 HDL은 GPx의 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다(Table 1).

SOD는 superoxide ($\cdot O_2$)를 산소와 H₂O₂로 바꿔주는 불균등화(dismutation) 반응을 촉매하는 효소로 알려져 있다. U2OS 세포에 CoCl₂ 및 HDL을 처리한 후 BIOXYTECH® SOD-525™ kit를 사용하여 SOD를 측정된 결과, 200 μM 농도의 CoCl₂를 12시간 동안 처리하였을 경우 control에 비하여 SOD의 활성이 32% 감소하였다. 그리고 200 μM 농도의 CoCl₂와 HDL을 농도 별로 함께 처리한 경우 HDL의 농도 의존적으로 SOD의 활성이 증가하였으며, CoCl₂에 의해 32% 감소되었던 SOD의 활성이 10 μg/ml 농도의 HDL에 의해 8%의 감소율을 보였다. 이 결과는 CoCl₂에 의해 감소된 SOD의 활성이 HDL에 의해 증가된 것을 나타낸다(Table 1).

HDL의 ferritin 함량 및 ferritin iron 농도에 대한 효과

CoCl₂는 세포 내에서 free radical을 생성하여 산화에 의한 스트레스 손상을 유도하며, heme oxygenase (HO)를 포함하는 몇몇 스트레스에 반응하는 단백질을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. HO는 반응속도를 제한시키는 마이크로솜 효소(rate-limiting microsomal enzyme)이며[13], 헴(heme)을 가수분해하여 일산화탄소, 철(iron), 그리고 빌리베르딘(biliverdin)을 형성하는 것으로 알려져 있다. Ferritin은 철분을 저장하며, 철분 대사를 조절하는 가장 기본적인 단백질로 알려져 있다 [37]. 세포가 호흡을 할 때 산소를 소비하면서 한 분자의 ferrous iron을 ferric form으로 전환하여, 무독한 상태로 저장한다. 저장된 iron은 ferritin으로부터 방출되고, 생합성 과정에 이용된다[48]. Free radical 생성에 의해 ferritin의 손상이 유도되면 세포는 free iron을 방출하게 되어 산화적 손상을 상승시키게 된다.

U2OS 세포에 200 μM의 CoCl₂를 24시간 동안 처리하여 시간에 따른 세포내의 ferritin의 함량과 ferritin iron의 농도 변화를 조사하였다. 그 결과 200 μM 농도의 CoCl₂를 24시간 동안 처리 시 control에 비하여 ferritin의 함량은 60% (3.1±0.05 10¹pg/μg)가 증가하였다. 그리고 CoCl₂에 의한 세포내의 ferritin iron의 농도는 control에 비하여 89% (3.1±0.05 pmol/μg)가 증가하였다. 이 결과는 CoCl₂에 의해 생성된 산화적 스트레스에 세포가 저항성을 높이기 위해 세포내의 ferritin과 ferritin iron을 증가시킨 것으로 사료된다(Fig. 3).

CoCl₂에 의해 생성된 세포내의 ferritin과 ferritin iron에 대한 HDL의 영향을 조사하기 위해 U2OS 세포에 200 μM의

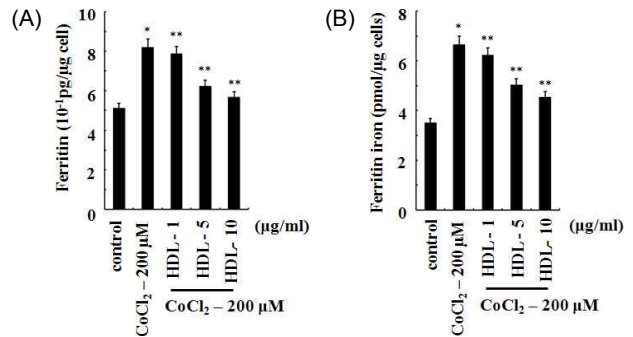


Fig. 3. The effect of HDL on ferritin and ferritin iron contents increased by CoCl₂ in U2OS cells. The effect of various concentrations of HDL on ferritin (A) and ferritin iron (B) contents increased by CoCl₂. Values represent the mean of at least three independent experiments; bars, S.D. Results were statistically significant (*, *p*<0.05 compared with control; **, *p*<0.01 compared with CoCl₂ only treatment) using Student's *t* test.

CoCl₂와 HDL을 농도 별로 함께 처리하여 24시간 후 ferritin 함량 및 ferritin iron의 농도를 측정하였다. 그 결과 CoCl₂에 의해 증가되었던 ferritin 함량 및 ferritin iron의 농도가 HDL에 의해 농도 의존적으로 감소하였다. 200 μM 농도의 CoCl₂를 처리하였을 경우 control에 비하여 36% 증가하였던 ferritin의 함량은 10 μg/ml 농도의 HDL에 의해 10.5% (0.54±0.001 pg/μg)의 증가를 보였다. 그리고 200 μM 농도의 CoCl₂에 의해 89%가 증가한 ferritin iron의 농도는 HDL에 의해 29% (1.02±0.001 pmol/μg)의 증가를 보였다. 이 결과는 CoCl₂에 의해 생성된 free radical을 HDL이 항산화 효과를 통해 저해함으로써 ferritin의 손상과 free iron의 방출을 억제하는 것으로 사료된다 (Fig. 3).

HDL의 Glutathione (GSH) 농도 및 Lipid peroxidation에 대한 효과

불포화지방산이 산소에 노출되면 Lipid peroxidation이 일어난다. Lipid peroxidation은 free radical에 의해 불포화지방산의 methylene (-CH₂-)기로부터 수소원자(H·)를 탈취하여 시작된다. 이런 반응을 자극하는 free radical로는 $\cdot OH$, RO·, ROO·, HO₂· 등이 알려져 있으며, O₂과 H₂O₂는 그 자체로는 반응을 자극할 수 없는 것으로 알려져 있다[16]. 또한 빛(light) 또는 금속이온이 Lipid peroxidation 반응을 야기할 수 있는 것으로 알려져 있다. 수소탈취에 의해 생긴 alkyl radical (R·)은 분자재구성을 통해 디엔(diene, 분자 안에 탄소-탄소 이중결합을 2개 가진 화합물)형태로 바뀌고 이것이 다시 산소와 결합하여 peroxy radical을 형성한다. Peroxy radical은 또한 분자재구성을 통해 여러 형태의 과산화물로 전환된다. Lipid peroxidation의 산물은 그 자체로는 상당히 안정되나 전이금속의 존재 하에서는 분해가 촉진된다. Lipid perox-

idation의 분해산물은 다양하며 많은 종류의 carbonyl 화합물을 포함한다. 그 중 대표적인 물질이 MDA로서 thiobarbituric acid (TBA) 반응을 통하여 검출할 수 있다[4,7,39].

세포 내 Lipid peroxidation enzyme은 TBA와 반응하는 TBARS의 생성 비율을 이용하여 측정하였다[36]. U2OS 세포에 200 μM 의 CoCl_2 를 6시간 동안 처리하여 세포내의 TBARS의 농도 변화를 조사한 결과 control (0.09 \pm 0.001 pmol/ μg protein)에 비해 110.8% (0.20 \pm 0.001 pmol/ μg protein)의 TBARS 농도가 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4B). CoCl_2 에 의한 세포내의 GSH의 농도는 TBARS의 농도와 상반된 경향을 보였다. U2OS 세포에 200 μM 농도의 CoCl_2 를 처리하여 6시간 동안 처리하여 세포내의 GSH의 농도를 조사한 결과 control (7.2 \pm 0.01 pmol/ μg cells)에 비하여 GSH의 농도가 34% (4.8 \pm 0.01 pmol/ μg cells)가 감소하였다(Fig. 4A). 이 결과는 CoCl_2 에 의해 생성된 H_2O_2 를 가수분해하기 위해 GSH를 산화시켜 GSSG를 생성하기 때문에 GSH의 농도가 감소된 것으로 사료되며, 가수분해되지 못한 H_2O_2 는 펜톤반응(Fenton reaction)에 의해 $\cdot\text{OH}$ 로 전환되어 지질과산화물을 유도한 것으로 사료된다.

CoCl_2 에 의해 감소된 세포내의 GSH의 농도와 증가된 TBARS의 농도에 대한 HDL의 영향을 조사하기 위해 U2OS 세포에 200 μM 의 CoCl_2 와 HDL을 농도 별로 함께 처리하여 6시간 후 GSH의 농도와 TBARS의 농도를 각각 측정하였다. 그 결과 CoCl_2 에 의해 증가되었던 TBARS의 농도는 HDL에 의해 감소하였고, 감소하였던 GSH의 농도는 증가하였다. 200 μM 농도의 CoCl_2 를 처리하였을 경우 control에 비하여 34% 감소하였던 GSH의 농도는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 HDL에 의해 4.8% (0.33 \pm 0.001 pmol/ μg cells)의 감소를 보였다(Fig. 4A).

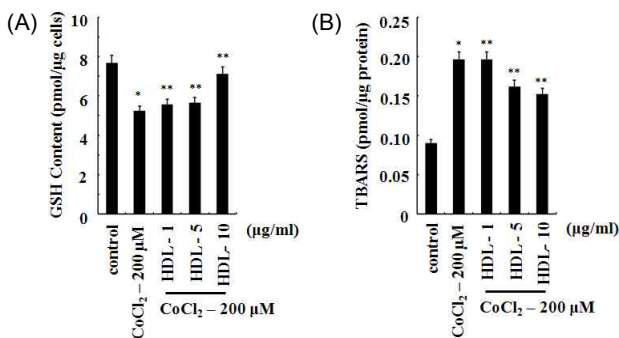


Fig. 4. The effect of HDL on intercellular GSH and lipid peroxidation decreased by CoCl_2 in U2OS cells. The effect of various concentrations of HDL on intercellular GSH and lipid peroxidation increased by CoCl_2 in U2OS cells. Lipid peroxidation was represented the ratio of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) reacted with thiobarbituric acid. Values represent the mean of at least three independent experiments; *bars*, S.D. Results were statistically significant (*, $p < 0.05$ compared with control; **, $p < 0.01$ compared with CoCl_2 only treatment) using Student's *t* test.

그리고 200 μM 농도의 CoCl_2 에 의해 110.8%가 증가한 TBARS의 농도는 HDL에 의해 69% (0.62 \pm 0.001 pmol/ μg)의 증가를 보였다(Fig. 4B). 이 결과는 CoCl_2 에 의해 생성된 H_2O_2 를 HDL이 가수분해하여 지질과산화의 유도를 억제한 것으로 사료된다.

HDL에 의한 단백질 발현 변화 분석

단순히 호흡과정에서 생성되는 부산물로 여겨졌던 ROS는 최근 외부자극에 의하여 세포막에 존재하는 수용체를 통하여 일시적으로 생성되어 세포신호전달의 이차 신호전달물질(second messenger)로서 작용한다고 보고되고 있다. 고농도의 ROS는 핵산, 지질 및 단백질 등의 생체 화합물에 산화적 손상을 유도하며, 특정 부위에 생성되는 낮은 농도의 ROS는 세포의 성장 등의 조절에 관여하는 세포 내 이차 전달물질로 알려져 있다[22,44].

CoCl_2 는 전이금속으로 세포에 처리하였을 경우, 산소 농도가 1% 이하의 저산소 상태와 유사한 상태(mimic hypoxia)를 유도하는 것으로 잘 알려져 있다. 그리고 CoCl_2 는 세포 내 DNA 손상이 아닌 미토콘드리아에 손상을 입혀 ROS를 생성한 후, hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α), p53, p21 및 PCNA 등의 단백질의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[11,31]. 본 연구에서는 CoCl_2 에 의한 ROS의 생성에 의해 발현이 증가한 p53, p21^{Waf1/Cip1} 및 p27^{Kip1} 단백질에 대한 HDL의 저해효과를 웨스턴 블롯 분석법으로 확인하였다.

200 μM 의 CoCl_2 와 HDL을 농도 별로 U2OS 세포에 함께 12시간 동안 처리하였다. 그 결과 CoCl_2 에 의해 발현이 증가되었던 p53 단백질이 HDL에 의해 농도 의존적으로 감소하였다. 그리고 p53에 의해 전사활성이 유도되는 p21^{Waf1/Cip1}, 세포주기와 관련된 단백질인 p27^{Kip1}의 발현을 확인하였다. 200 μM 농도의 CoCl_2 를 처리하였을 경우 발현이 증가하였던 p21^{Waf1/Cip1}은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 HDL에 의해 낮은 수준으로 감소하는 것을 보였으며, p27^{Kip1}은 HDL의 처리에 의해 발현의 변화가 없었다. 이 결과는 HDL에 의해 항산화 기전을 바탕으로 세포주기와 관련된 단백질이 조절되는 것으로 사료된다(Fig. 5A)

HDL에 의한 세포주기 변화 분석

CoCl_2 와 HDL을 U2OS 세포에 함께 처리하여 세포주기와 관련된 단백질을 웨스턴 블롯 분석법을 이용하여 확인하였다. 단백질의 발현 변화 결과를 바탕으로 FACS를 이용하여 세포주기를 측정하였다. CoCl_2 와 HDL을 U2OS 세포에 함께 24시간 동안 처리하여 세포를 80% 에탄올에 고정한 후, DNA를 PI 용액에 염색한 후, FACS Calibur flow cytometry를 이용하여 세포주기를 측정하였다. 그 결과 control의 경우 전체 세포주기 중 50.3%, 200 μM 농도의 CoCl_2 처리를 처리하였을 경우 65.2%의 세포가 G1 phase에서 관찰되었다. 이는 200 μM 농도의 CoCl_2 에 의해 U2OS세포가 G1 phase에서 30% 증가한 것을 나타낸다. 그리고 CoCl_2 와 HDL을 농도 별로 함께 처리한 경

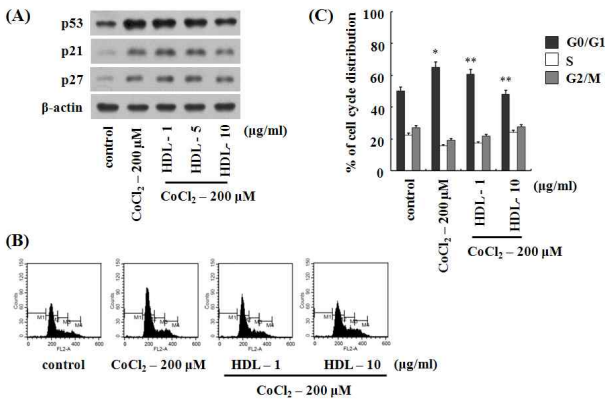


Fig. 5. The effect of HDL on G1 phase cell cycle and its regulatory proteins in U2OS cells. (A) Various concentrations of HDL were treated with CoCl₂ 200 μM for 12 hr and thereafter harvested, total cell lysates prepared and then subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis to determine the expression of p53, p21, and p27 proteins. β-actin was used to verify equal loading of the samples. Representative blots are shown from three independent experiments with almost identical results. (B) Various concentrations of HDL were treated with CoCl₂ 200 μM. After 12 hr of treatment, cells were harvested and digested with RNase. Cellular DNA was stained with propidium iodide and flow cytometric analysis was performed to analyze the cell cycle distribution, as described in the Materials and methods. (C) Data from the cell cycle distribution were summarized and values represent the mean of at least three independent experiments; bars, S.D. Results were statistically significant (*, *p*<0.05 compared with control; **, *p*<0.01 compared with CoCl₂ only treatment) using Student's *t* test.

우 G1 phase의 세포가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. CoCl₂에 의해 30% 증가되었던 G1 phase의 세포가 48.1%가 관찰되었다. 이 결과는 산화적 스트레스를 유도하는 CoCl₂에 의해 증가된 G1 phase의 세포가 항산화 효과를 가진 HDL에 의해 G1 phase에 억제되지 않고 정상 상태의 세포주기를 유지하는 것으로 사료된다(Fig. 5B and C).

고 찰

본 연구는 유근피에서 분리한 화합물인 HDL을 이용하여 CoCl₂에 의해 생성된 ROS를 바탕으로 항산화 기전 및 ROS 생성에 관련된 효소에 대한 저해효과를 규명하였다. 뿐만 아니라, 생성된 ROS를 통해 조절되는 단백질 발현의 양상을 분석하고 세포주기에 미치는 영향을 조사하였다.

자유라디칼은 홀전자(unpaired electron)를 갖고 불안정한 상태의 분자를 가리키는 것으로서[42] 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS) 및 ROS로 나눌 수 있다. RNS는 nitric oxide (NO)와 반응하여 생성되는 부산물들을 가리키며, RNS

의 종류는 nitrogen oxide (NO₂), nitrous acid (HNO₂), peroxy-nitrite (ONOO-) 등이 있다. 특히 NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 ROS인 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$)와 쉽게 반응하여, 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxy-nitrite를 생성한다[33,39]. 이 RNS는 대식세포, 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량으로 생성되어 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine을 기질로 하여 합성되며[10,32], 거의 대부분의 포유동물에서 세포내 messenger로 작용한다. 뿐만 아니라 혈관의 항상성 유지, 신경전달, 면역계 등에 관여한다[15,25]. 그리고 ROS는 외부로부터의 여러 가지 요인 및 과도한 스트레스에 의한 체내의 생화학적 반응에 의해 생성되며, ROS의 종류는 $\cdot O_2^-$, H₂O₂, singlet oxygen (1O_2), 그리고 지질의 free radical 즉, alkoxy radical (RO \cdot), peroxy radical (ROO \cdot) 등이 있다.

산소를 전자전달계의 수용체로 사용하는 모든 생물체들은 정상적인 대사과정에 사용하는 산소 중 약 1% 정도는 불완전하게 환원되어 ROS를 생성한다. 일반적인 대사과정에서 생성되는 ROS는 $\cdot O_2^-$ 이며, 이 superoxide로부터 H₂O₂, OH \cdot , RO₂ \cdot 등이 파생되어 생성된다. 이 중 H₂O₂는 생체막을 자유로이 통과하여 전이금속과 펜톤 반응에 의해 OH \cdot 로 변환된다. 생성된 ROS는 반응성이 대단히 높아서 세포내에 발생된 주변 장소의 거대 생체 분자들을 변형시키게 된다. ROS가 표적으로 하는 세포내 거대생체 분자는 지질, 핵산, 단백질 등 세 종류가 있다. ROS는 이 분자들을 산화시켜 염증을 유발하고 세포내 여러 조직을 손상시키며, 많은 퇴행성 질환, 즉 암, 노화, 동맥경화, 류마티스 관절염, 그리고 알레르기에 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다[3,8,17].

그리고 ROS에 의해 생성된 산화물 및 분해산물들은 생체분자들의 구조와 기능을 변화시켜 지질과산화물을 초래한다. 지질과산화로 인해 지질분자의 구조적 변화가 넓은 범위에 걸쳐 일어나면 생체막 유동성(fluidity)의 감소, 세포막전위(membrane potential)의 감소, 이온투과성의 증가, 세포소기관 내용물의 누출 등이 야기되며, 결국은 세포기능의 저하와 세포의 죽음을 초래할 수 있다. Lipid peroxidation의 산물 및 분해산물 중에는 생체에 유해한 성분들이 있으며 대식세포기능의 억제, 단백질합성 억제, 효소의 활성억제, 트롬빈(thrombin) 과다생산 등과 같은 유해 작용들이 보고되어 왔다[18]. HDL은 CoCl₂에 의해 유발된 XO를 억제하여 세포내 ROS의 생성을 감소시켰다. 그리고 산화와 관련된 SOD, CAT의 활성을 증가시켜 지질과산화에 의한 세포내 생체분자들의 손상 억제를 통하여 산화적 스트레스에 의한 손상을 억제하는 것으로 사료된다.

세포 주기의 조절은 cyclin과 cyclin dependent kinase (CDK) 복합체에 의해 조절된다[38,49]. Cyclin-CDK 복합체를 조절하는 인자로는 CDK inhibitor로 알려진 INK4 family와 CIP1/KIP1 family가 있다. INK4 family의 종류는 p15^{INK4B},

p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, 그리고 p19^{INK4D}이 알려져 있으며, CIP/KIP family의 종류는 p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1}, 그리고 p57^{KIP2}이 알려져 있다. INK4 family는 CDK4/CDK6/Cyclin D 복합체를 주로 저해하는 것으로 알려져 있으며, CIP/KIP family는 CDK4/CDK6/Cyclin D 복합체와 CDK2/Cyclin E 복합체 모두를 저해하는 것으로 알려져 있다. 그리고 CIP/KIP family 중 p21^{CIP1/WAF1}은 G1 checkpoint에서 DNA가 손상되었을 때 활성화되는 tumor suppressor gene인 p53에 의해 전사활성이 유도되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 U2OS 세포에서 CoCl₂에 의한 ROS의 생성은 세포사멸이 아닌 일시적인 G1 세포주기 억제를 유도하였으며, p53, p27^{KIP1}, 그리고 p21^{CIP1/WAF1} 단백질의 증가를 유도하였다. 항산화 효과를 가진 HDL에 의해 발현이 증가한 p53은 이 감소되었으며, 세포주기의 억제 또한 저해되었다. 이 과정에서 HDL의 항산화 효과에 의해 p53 및 p53에 의해 활성화되는 p21^{CIP1/WAF1}의 발현을 감소시켰으며, p27^{KIP1}의 발현에는 영향을 미치지 못했다. HDL에 의한 세포주기 회복은 특이적으로 p53과 p21^{CIP1/WAF1} 단백질에 의존적인 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과 유근피로부터 분리한 HDL이 항산화 효소의 증가를 통해 CoCl₂에 의해 유도된 산화적 스트레스를 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 본 연구는 HDL을 이용하여 독성이 없고 효과적인 천연 항산화제에 대한 학문적 기초 자료를 제공하였으며, 앞으로 이와 관련한 유근피의 HDL을 비롯한 다른 성분이 질병치료에 어떠한 조절기전을 바탕으로 치료효과를 갖는지에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

References

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro* Meth. Enzymol. **105**, 121-126.
- Anderson, M. E. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Meth. Enzymol. **113**, 548-555.
- Azad, N., Y. Rojanasakul, and V. Vallyathan. 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. **11**, 1-15.
- Benzie, I. F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. Int. J. Food Sci. Nutr. **47**, 233-261.
- Buege, J. A. and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid Peroxidation. Meth. Enzymol. **52**, 302-310.
- Cai, H. and D. G. Harrison. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ. Res. **87**, 840-844.
- Cantrill, R. C., G. W. Ells, A. C. DeMarco, and D. F. Horrobin. 1997. Mechanisms of the selective cytotoxic actions of certain essential fatty acids. Adv. Exp. Med. Biol. **400A**, 539-544.
- Caron, M., M. Auclairt, A. Vissian, C. Vigouroux, and J. Capeau. 2008. Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. Antivir. Ther. **13**, 27-38.
- Cerutti, P., R. Ghosh, Y. Oya, and P. Amstad. 1994. The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. Environ. Health Perspect. **10**, 123-129.
- Chen, L. and H. Y. Zhang. 2007. Cancer preventive mechanisms of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. Molecules **12**, 946-957.
- Christova, T. Y., D. B. Duridanova, and M. S. Setchenska. 2002. Enhanced heme oxygenase activity increases the antioxidant defense capacity of guinea pig liver upon acute cobalt chloride loading: comparison with rat liver. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. **131**, 177-184.
- De Oliveira, S. Q., F. Dal-Pizzol, G. Gosmann, D. Guillaume, J. C. Moreira, and E. P. Schenkel. 2003. Antioxidant activity of Baccharis articulata extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. Free Radic. Res. **37**, 555-559.
- Drummond, G. S. and A. Kappas. 1979. Manganese and zinc blockade of enzyme induction: studies with microsomal heme oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5331-5335.
- Gao, L., R. Mejias, M. Echevarria, and J. López-Barneo. 2004. Induction of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression by chronic hypoxia in PC12 cells. FEBS Lett. **569**, 256-260.
- Gebska, A., R. Olszanecki, and R. Korbut. 2005. Endotoxaemia in rats: role of leukocyte sequestration in rapid pulmonary nitric oxide synthase-2 expression. J. Physiol. Pharmacol. **56**, 299-311.
- Gower, J. D. 1988. A role for dietary lipids and antioxidants in the activation of carcinogens. Free Radic. Biol. Med. **5**, 95-111.
- Hadjigogos, K. 2003. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Panminerva Med **45**, 7-13.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Mol. Aspects Med **8**, 89-193.
- Hong, N. D., Y. S. Rho, N. J. Kim, and J. S. Kim. 1990. 2002. A study on efficacy of *Ulm* cortex. Kor. J. Pharmacogn. **21**, 217-222.
- Huh, J. 2006. Dae-Yeok Donguibogam. pp. 2217, Donguibogam press, Gyeongnam, Korea.
- Jin, U. H., S. J. Suh, S. D. Park, K. S. Kim, D. Y. Kwon, and C. H. Kim. 2008. Inhibition of mouse osteoblast proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Ulmus davidiana* Planch (*Ulmaceae*). Food Chem. Toxicol. **46**, 2135-2142.
- Kakkar, P. and B. K. Singh. 2007. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. Mol. Cell. Biochem. **305**, 235-253.
- Kalinovskii, A. I. and N. I. Chetyrina. 1980. ¹³C NMR spectra of acetylated hederagenin glycosides. Chem. Nat. Compd+. **16**, 269-271.
- Kim, K. S., S. D. Lee, K. H. Kim, S. Y. Kil, K. H. Chung, and C. H. Kim. 2005. Suppressive effects of a water extract of *Ulmus davidiana* Planch (*Ulmaceae*) on collagen-induced

- arthritis in mice. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 65-71.
25. Kleinert, H., A. Pautz, K. Linker, and P. M. Schwarz. 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 255-266.
 26. Ko, J. H. and K. T. Lim. 2006. Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* NAKAI protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in the mouse. *J. Pharmacol. Sci.* **101**, 205-213.
 27. Krieger-Liszkay, A. and A. Trebst. 2006. Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *J. Exp. Bot.* **57**, 1677-1684.
 28. Lee, C. 1990. Pon-Cho. Pyeon-Joo Uihak-Ipmun. pp. 194, *Dae Sung press, Seoul, Korea.*
 29. Lee, S. J., S. J. Heo, P. S. Oh, K. Lim, and K. T. Lim. 2004. Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai inhibits TPA-induced apoptosis through nuclear factor-kappa B in NIH/3T3 cells. *Toxicol. Lett.* **146**, 159-174.
 30. Lee, Y. Y., D. S. Jang, J. L. Jin, and H. S. Yun-Choi. 2005. Anti-platelet aggregating and anti-oxidative activities of 11-O-(4'-O-methylgalloyl)-bergenin, a new compound isolated from *Crassula* cv. 'Himaturi'. *Planta Med.* **71**, 776-777.
 31. Lin, J. H., P. Villalon, P. Martasek, and N. G. Abraham. 1990. Regulation of heme oxygenase gene expression by cobalt in rat liver and kidney. *Eur. J. Biochem.* **192**, 577-582.
 32. Mai, T. T., N. N. Thu, P. G. Tien, and N. Van Chuyen. 2007. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **53**, 267-276.
 33. Malinski, T., Z. Taha, S. Grunfeld, S. Patton, M. Kapturczak, and P. Tomboulian. 1993. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 1076-1082.
 34. Matés, J. M. and F. Sánchez-Jiménez. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosci.* **4**, 339-349.
 35. Mostafa, M., N. Nahar, M. Mosihuzzaman, T. Makhmoor, M. I. Choudhary, and A. U. Rahman. 2007. Free radical scavenging phenylethanoid glycosides from *Leucas indica* Linn. *Nat. Prod. Res.* **21**, 354-361.
 36. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
 37. Palmour, R. M. and H. E. Sutton. 1971. Vertebrae transferrins. Molecular weights, chemical compositions, and iron-binding studies. *Biochemistry* **10**, 4026-4032.
 38. Pardee, A. B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608.
 39. Radi, R., J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244-4250.
 40. Ray, G. and S. A. Husain. 2002. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J. Exp. Biol.* **40**, 1213-1232.
 41. Rikans, L. E. and K. R. Hornbrook. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta* **362**, 116-127.
 42. Riley, P. A. 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 27-33.
 43. Roskams, A. J. and J. R. Connor. 1994. Iron, transferrin, and ferritin in the rat brain during development and aging. *J. Neurochem.* **63**, 709-716.
 44. Sen, C. K. 2000. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell Regul.* **36**, 1-30.
 45. Son, B. H., J. H. Park, and O. P. Zee. 1989. Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*. *Arch. Pharmacol. Res.* **12**, 219-222.
 46. Son, Y. O., K. Y. Lee, K. C. Choi, Y. Chung, J. G. Kim, Y. M. Jeon, Y. S. Jang, and J. C. Lee. 2004. Inhibitory effects of glycoprotein-120 (G-120) from *Ulmus davidiana* Nakai on cell growth and activation of matrix metalloproteinases. *Mol. Cells* **18**, 163-170.
 47. Sumbayev, V. V. and I. M. Yasinska. 2002. The effect of CoCl₂ on xanthine oxidase, nitric oxide synthase, and protein kinase C activity as well as cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 quantities in rat liver. *Ukr. Biochim. Zh.* **74**, 117-120.
 48. Theil, E. C. 1987. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 289-315.
 49. Xiong, Y., T. Connolly, B. Futcher, and D. Beach. 1991. Human D-type cyclin. *Cell* **65**, 691-699.
 50. Zweier, J. L., R. Broderick, P. Kuppasamy, S. Thompson-Gorman, and G. A. Luty. 1994. Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **269**, 24156-24162.

초록 : 유근피로부터 분리한 hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside (HDL)의 항산화 효과

봉진구 · 박윤엽^{1*}

(대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실, ¹대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실)

본 연구는 유근피(root bark of *Ulmus davidiana*)에서 분리한 화합물인 hederagenin 3-O-b-D-glucopyranosyl(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl(1→2)-a-L-arabinopyranoside (HDL)을 이용하여 CoCl₂에 의해 생성된 ROS에 대한 항산화 기전을 밝히기 위하여, ROS 생성과 관련된 산화 효소 및 항산화 효소에 대한 저해효과를 조사하였다. 또한 HDL이 CoCl₂에 의해 생성된 ROS의 조절을 통해 산화적 스트레스와 관련된 단백질 발현 및 세포주기에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 HDL은 CoCl₂에 의해 유발된 xanthine oxidase와 H₂O₂ 생성 증가를 억제하였고, 산화와 관련된 SOD, CAT의 활성을 증가시켜 H₂O₂의 가수분해를 촉진하였다. 그리고 HDL은 CoCl₂에 의해 유발된 ferritin의 손상과 ferritin iron의 방출을 억제하였으며, 지질과산화의 증가를 억제하였다. 뿐만 아니라 HDL은 CoCl₂에 의해 증가된 G1 phase의 세포를 감소시켰으며, 세포주기와 관련된 p53 및 p21^{CIP1/WAF1}의 발현을 감소시켰다. 이러한 연구결과들은 HDL이 천연물로부터 유래한 독성이 없는 항산화제로서의 가능성을 제시한다.