Journal of Life Science **2010** Vol. 20. No. 5. 736~744 ©JLS / ISSN 1225-9918

Inhibitory Effect of Aged Black Platycodi Radix Extract on Expression and Activation of Matrix Metalloproteinases in Oxidative-stressed Melanoma Cells

Yong-Byung Chae, Ho-Jung Jang[1], Jung Ae Park[1], Soo-Jin Lee, Moon-Moo Kim and Kyung Tae Chung[2]*

Department of Chemistry, [1]Department of Life Science and Biotechnology [2]Department of Clinical Laboratory Science and Blue-Bio Industry RIC, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received February 18, 2010 / Accepted March 19, 2010

The root of *Playtcodon grandiflorum*, called Platycodi radix, has been a favorite edible plant in Asia and contains a large amount of saponins. Melanoma cells (B16F10) were used to investigate the inhibitory effect of aged black Platycodi radix extract (ABPRE) on oxidative stress and matrix metalloproteinases (MMPs). Platycodon radix has been known to have a variety of medicinal effects such as prevention of gastric ulcers, antiallergenic activities, histamine release inhibition, and antioxidant effects. However, the mechanism of its action remains unclear in humans. ABPRE was prepared using ethanol extraction of aged black Platycodi radix. In an antioxidant effect study of ABPRE, it was observed that ABPRE specifically exhibited the scavenging activity of DPPH radical, but did not inhibit the production of malondialdehyde from lipid peroxidation. DNA oxidation was also blocked in the presence of ABPRE. In addition, ABPRE decreased the expression and activation of MMP-2 stimulated by phenazine methosulfate. Furthermore, ABPRE revealed the inhibitory effect on melanin production induced by L-dopa via antioxidant effect and the reduction of tyrosinase expression. Especially, the expression of antioxidant enzymes such as SOD-1 and SOD-2 regulated by Nrf2 was increased in the presence of ABPRE. Therefore, it appears that ABPRE may be a possible chemopreventive agent for the prevention of metastasis related to oxidative stress.

Key words : Aged black Platycodi radix, antioxidant, DPPH radical, DNA oxidation, MMPs

서 론

인간의 생체 내에서 필요한 에너지 공급을 위해 끊임 없이 일어나는 생화학 반응에서 발생하는 활성산소는 자기 방어 기구인 생체 내 소거기전에 의해 대부분 제거된다. 그러나 활성산소가 정상적으로 소거되지 않아 산화적 스트레스가 생체 내에 가해지면, 이들 활성 산소는 세포 구성 성분들인 지질, 단백질, 탄수화물과 DNA 산화적 손상 및 효소 활성을 변화시켜 뇌졸중, 파킨슨씨 병과 같은 뇌 질환뿐만 아니라 심장질환, 허혈, 동맥경화 등과 같은 성인병 및 암 등의 각종 질병을 일으키는 원인이 되며, 또한 활성 산소종은 생체 조직을 손상시킬 뿐만 아니라 노화를 촉진 시킨다고 보고 되어 있다[18,25, 31,32]. 더불어 피부 진피층 기질을 이루는 중요한 성분의 하나인 콜라겐의 생합성과 분해는 피부 노화에 핵심이 되고 있다. 활성산소는 피부 섬유아세포에서 matrix metalloproteinase (MMPs)의 발현을 촉진하며 또한, 자외선에 의한 collagenase의 합성을 촉진 시킨다고 보고되어 있다[29,34]. MMPs는 다양한 생리적 및 병리적 조직 재편성에 중요한 역할을 담당하는 아연(Zn) 의존형 효소군으로 특히 혈관 생성과 연관된 암전이에 관여하는 것으로 알려져 있는 항암치료의 표적분자이다. MMPs 중 MMP-2와 MMP-9가 암전이에 중요하게 작용한다고 보고되고 있다. 따라서 활성 산소종과 자외선에 의한 인체 내 손상이나 노화를 감소 또는 방어하기 위해 항산화제의 개발이 필요하다.

한편, Melanin은 생물체에 널리 분포 되어 있는 색소로 피부에서는 표피층에 있는 melanocyte에서 합성된다. 멜라닌은 피부 표피의 기저층에 위치한 melanocyte 내 소기관인 melanosome에서 tyrosine이 tyrosinase효소에 의해서 합성되는데 tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정 단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanone (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 dopaquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다[28]. Melanocyte에 대한 자극으로 인하여 생성되는 멜라닌 과량 침착으로 기인한 기미, 흑반병과 색소 결핍에 의한 백반증과 백색증이 있다. Melanocyte 세포내부에 존재하는 melanosome은 발달된 수지상 돌기를 통해 기저세포로 이동하고 각질형성세포가 표피 밖으로 이동하면서 멜라닌을 증가시켜 기미를 형성한다[5]. 이와 같이 세포 내 melanin이 과잉 생산되면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소 침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하므로 천연의 식물 추출물을 대상으로 항산화 및 미백 유효 추출물을 찾아내는 것이 중요하다.

*Corresponding author
Tel : +82-51-890-2681, Fax : +82-51-890-2622
E-mail : kchung@deu.ac.kr

최근, 활성 산소종에 의한 인체 내 손상을 보호하는 항산화 물질에 대한 연구는 다양하게 이루어지고 있으며, 특히 식물에 활성 산소종을 제거할 수 있는 항산화 성분들이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 과일, 야채, 차, 허브 등과 같은 식물로부터 얻어진 vitamin, 페놀화합물, 카로티노이드 등의 항산화 물질에 대한 많은 연구가 보고 되어 있다[3,30].

그 중 도라지(*Platycodon grandiflorum* A.DC)는 한국, 일본 및 중국의 산간지방에서 널리 자생하며, 식용으로 이용되고 있는 산채식품으로 배농, 거담, 기관지염, 천식 등의 호흡기 질환에 사용되어온 생약재로서 약리성분에 대한 연구는 platycodigenin을 분리함으로써 도라지에 대한 관심이 고조 되었다[21]. 보고된 주요 약리활성 성분으로는 terpnoid계 saponin으로 동물 실험에서 진해, 거담 작용, 중추신경 억제작용, 급만성염증, 항궤양 및 위액 분비 억제작용, 혈관을 확장 하여 혈압을 낮추는 항콜린작용, 혈당강화 작용, 콜레스테롤 대사 개선 작용 등이 있는 것으로 밝혀져 있다[17,22,26]. 이러한 약리 효능이 밝혀져 있지만, 약리적 기능을 이용하여 부가가치가 높은 제품 개발의 경우는 극히 제한적이다.

따라서, 도라지의 활용을 증가시키는 방법의 일환으로 개발된 흑도라지는 고온 습열 숙성방법을 통하여 개발되었다. 흑도라지는 일반 도라지와 다른 약리적 기능이 있을 것으로 예상되나 그 작용기전은 거의 알려진 바가 없다. 흑도라지의 항산화적 기능을 *in vitro*에서 검토 하였으며, 항산화 기능이 세포 내 산화적 DNA 손상을 보호하는 지에 대한 연구도 실시하였다. DNA의 산화적 손상은 암 발생과 밀접한 관계가 있어 암전이에 관련된 MMPs의 활성 및 발현에 대한 억제효과도 검토하였다. 본 연구결과는 흑도라지의 새로운 약리적 특성을 제공하며, 도라지를 고부가 가치 건강 기능식품으로 개발하는 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시료의 제조

실험에 사용된 도라지 뿌리는 국립농산물품질관리원 인정 무농약 도라지를 전북 장수군 소재 재배자로부터 직접 구입하였다. 도라지 뿌리를 흐르는 물에 3회 세척한 다음 자연 건조하였으며, 그 후 세척·건조된 도라지 뿌리를 100°C에서 30 min 동안 습열살균 처리한 후 항온·항습실에서 50~90°C까지 온도를 변화시키면서 약 16일 동안 숙성시켜 검은색의 흑도라지를 제조하였다. 시료는 진공 동결건조기를 이용해 동결건조시킨 다음 분쇄기로 분말화시켰다. 에탄올 추출물을 제조하기 위하여 동결 건조된 시료 100 g에 에탄올을 가하여 40°C에서 추출한 것을 3회 반복하고, 추출액을 여과한 여액을 회전식 진공농축기를 이용하여 완전 휘발시킨 다음 고형성분을 dimethyl sulfoxide를 이용하여 일정한 농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다. 세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin / streptomycin / amphotericin (각각 10,000 U/ml, 10,000 µg/ml 및 2,500 µg/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technologies (USA)로부터 구입하였다. B16F10 세포는American Type of Culture Collection (Manassas, VA, USA)로 부터 구입하였다. MTT reagent, gelatin, agarose, and PMS (phenazine methosulfate) 및 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

DPPH radical assay

Brand-Williams [16] 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 ABPRE의 소거능력을 측정하였다. 시험농도의 ABPRE를 DPPH 용액을 가하여 10 sec 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20 min 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 %값으로 환산하여 나타내었다.

Hydroxyl radical assay

Chung 등[36]의 실험방법을 변형하여 hydroxyl radical을 측정하였다. 50 µl의 10 mM $FeSO_4$와 50 µl의 10 mM H_2O_2를 이용한 Fenton 반응으로 hydroxyl radical를 발생시켰다. 발생된 radical을 25 µl의 10 mM EDTA, 25 µl의 10 mM 2-deoxyribose, 150 µl의 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)의 존재 하에서 시험농도의 ABPRE와 반응시킨 다음 37°C에서 4 hr 동안 반응시켰다. 여기에 250 µl의 2.8% TCA (trichloroacetic acid) 및 250 µl의 1% TBA (thiobarbituric acid)를 첨가한 후에 100°C로 가열하였다. 그 후 상온에서 식힌 다음 1,000× *g*에서 5 min 동안 원심분리 하였다. 회수한 상등액은 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 항산화 활성은 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 %값으로 환산 하였다.

Hydrogen peroxide scavenging assay

Choi 등 [7]의 실험방법을 변형하여 Hydrogen peroxide에 대한 소거활성을 측정하였다. 80 µl의 ABPRE, 20 µl의 10 mM Hydrogen peroxide 및 100 µl의 0.01 M 인산완충용액(pH5.0)을 37°C에서 5 min 동안 반응시켰다. 그 후, 15 µl의 1.25 mM ABTS 및 30 µl의 peroxidase 37°C에서 10 min 동안 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 항산화 활성은 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 %값으로 환산하였다.

환원력 assay

Oyaizu [23]의 방법에 따라 측정하였다. 시료 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20 min 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA (trichloroacetic acid)

용액을 1 ml 가하여 13,500× *g*에서 15 min 동안 원심분리하여 상등액 1 ml에 증류수 및 ferrous chloride 각 1 ml을 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력은 시료첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

세포배양

B16F10 세포는 5% CO_2 및 37°C에서 95% 이상의 습도를 유지한 배양기에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100 μg/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다.

MTT assay

Hansen [14]의 방법에 따라 B16F10세포에 대한 ABPRE의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

In vitro 지질과산화에 대한 항산화 활성

ABPRE를 10, 50, 100, 500 및 1,000 μg/ml의 농도가 되게 linolenic acid emulsion과 30 min 동안 혼합한 후 0.8 mM H_2O_2 및 0.8 mM $FeSO_4$를 혼합한 용액을 5 hr 동안 반응시킨 후 0.4% TBA를 첨가하고 95°C에서 2 hr 동안 반응시켜 실온에서 10 min 동안 반응시켰다. 그 다음, 15:1 비율의 n-butanol : pyridine 용액을 500 μl 첨가하고 1,000× *g*에서 10 min 동안 원심분리하여 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 지질과산화 정도는 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 %값으로 환산하였다.

세포에서 지질과산화에 대한 항산화 활성

6-well plate에 배양한 B16F10세포에 ABPRE를 시험농도 1 hr 동안 처리한 후에 80 mM H_2O_2 및 80 mM $FeSO_4$를 혼합한 용액 40 μl를 처리하여 5 hr 후 PBS로 2번 세척하였다. Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하여 각 well에 DMEM 500 μl 넣어 현탁한 다음 새 튜브에 옮긴 후 1,000× *g*에서 5 min 동안 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 1.2% KCl을 30 μl 넣고 혼합한 후 1% SDS 50 μl, acetic acid (pH 3.7) 375 μl, 0.8% TBA 375 μl를 첨가하여 95°C에서 2 hr 동안 반응시킨 후 실온에서 10 min 동안 반응시켰다. 그 다음 15:1 비율의 n-butanol : pyridine 용액을 500 μl 첨가 후에 1,000× *g*에서 10 min 동안 원심분리한 후, 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하여 지질과산화 정도는 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 %값으로 환산하였다.

세포 내 tyrosinase 활성 측정

6-well plate에 세포를 배양한 후 시료를 처리하고 24 hr 후 lysis buffer로 세포를 용해시켜 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 첨가하여 37°C에서 2 hr 동안 배양 한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hydroxyl radical에 의한 DNA 손상 분석

Genomic DNA는 약간 변형된 표준 과정에 따라 B16F10 세포로부터 추출하였다[27]. Fenton반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 노출된 DNA 산화는 기존에 실험된 방법에 따라 수행되었다 [20]. 먼저 100 μl의 DNA 용액에 시험농도의 ABPRE, 200 μM $FeSO_4$, 1 mM H_2O_2 및 50 μg/ml genomic DNA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 30 min 동안 상온에서 반응시킨 후 10 mM EDTA를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 1 μg의 DNA를 포함하는 20 μl의 반응혼합물을 1% agarose gel에서 100 V로 30 min 동안 전기영동하였다. Gel은 1 mg/ml ethidium bromide로 염색하여 물로 세척하여 UV로 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

Gelatin zymography

MMP-2 및 MMP-9 활성은 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에서 배양한 B16F10 세포에 ABPRE를 처리한 후 실험을 수행하였다[19]. 50 μg의 총단백질을 함유하는 세포배양액을 1.5 mg/ml gelatin을 포함하는 비환원조건의 10% polyacrylamide gels를 이용하여 전기영동하였다. Gelatin이 분해된 band를 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)로 관찰하여 대조군의 band를 100%로 하고 처리군 bands의 상대적인 값을 구하였다.

Western blot analysis

B16F10 세포에 용출 완충용액(50mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl2, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 μg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30 min 동안 처리하였다. 10 μg의 세포용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-MMP-2, anti-MMP -9, anti-Nrf2, anti-SOD-1, anti-SOD-2, anti-tyrosinase, anti-glutathione reductase, anti-beta-actin)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복 실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 농도군에 대한 유의 검정은 대조군과 비교하여 Student's

t test 한 후 $p<0.05$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

ABPRE의 DPPH radical, Hydrogen peroxide, Hydroxyl radical 소거 효과

DPPH radical 소거법은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 자색이 탈색에 의해 나타내는 정도를 지표로 하여 항산화 능력을 측정하는 방법이다[8].

Fig. 1A에서 보는 바와 같이 ABPRE를 10, 50, 250, 500, 1,000 μg/ml의 농도로 처리한 결과 DPPH radical 소거능은 10, 50, 100 μg/ml는 6.56%, 29.78%, 56.56%로 농도가 증가함에 따라 소거효과의 증가를 관찰 할 수 있었으나, 500 μg/ml 및 1,000 μg/ml는 100 μg/ml와 비슷한 소거효과를 보였다. 양성 대조군으로는 항산화 효과로 알려진 ascorbic acid를 사용하였는데 0.01%에서 62.85%의 DPPH radical 소거력을 보였다. ABPRE의 H_2O_2 소거능을 확인하기 위해 Hydrogen peroxide scavenging assay를 수행하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid 0.1%를 사용하였다. Fig. 1B에서 나타낸 것과 같이 ABPRE를 각각 10, 50, 100, 500, 1,000 μg/ml 씩 처리 하였을 때 농도 의존적으로 H_2O_2 소거능이 증가함을 볼 수 있었다. 그러나 대조군으로 사용한 vitamin C의 효과와는 큰 차이를 보였다.

반면에 ABPRE의 OH radical 소거능을 확인한 결과 vitamin C의 효과는 없었으나 ABPRE를 처리하였을 때 시료의 농도가 높을수록 유의성 있게 OH radical 소거능이 다소 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

항산화 반응과 같이 환원력은 항산화제로부터 제공되는 수소 원자가 free radical과 반응하여 시작하는데, Fig. 1D에서 보는 바와 같이 ABPRE를 각 농도별로 처리한 결과 환원력은 거의 없는 것으로 나타났다. 양성 대조군은 vitamin C 0.1%를 사용하였으며 29%의 환원력을 보였다.

In vitro 및 세포에서 지질과산화에 대한 ABPRE의 항산화 효과

*In vitro*에서 지질과산화에 대한 ABPRE에 의한 항산화 효과를 조사하기 위하여 linolenic acid를 Fenton반응으로 발생시킨 hydroxyl radical에 노출시켰다. 먼저 hydroxyl radical에

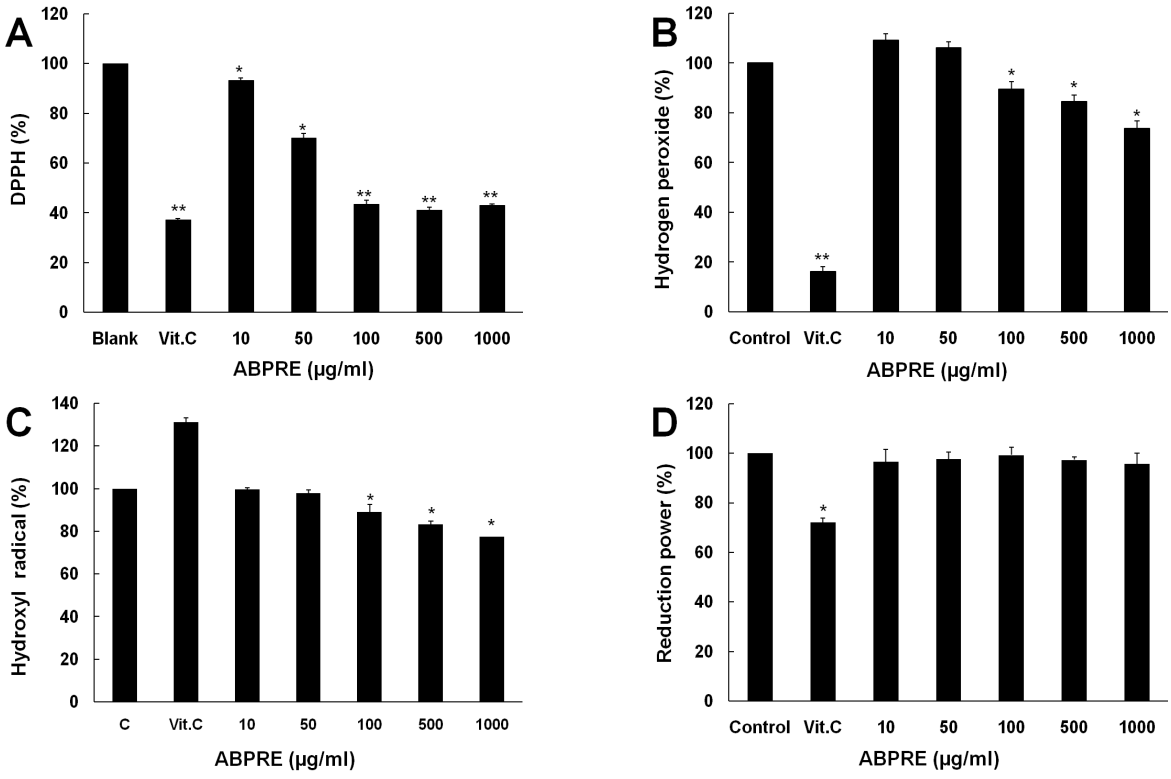

Fig. 1. Scavenging activities of ABPRE on DPPH radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and reducing power. DPPH radical (A), hydrogen peroxide (B), hydroxyl radical by Fenton reaction (C) and reducing power (D) was evaluated in the presence of ABPRE. After ABPRE at the indicated concentrations was reacted with each radical, the optical density of each reaction mixture was measured at a specific wavelength with spectrophotometer. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$) using Student's t test.

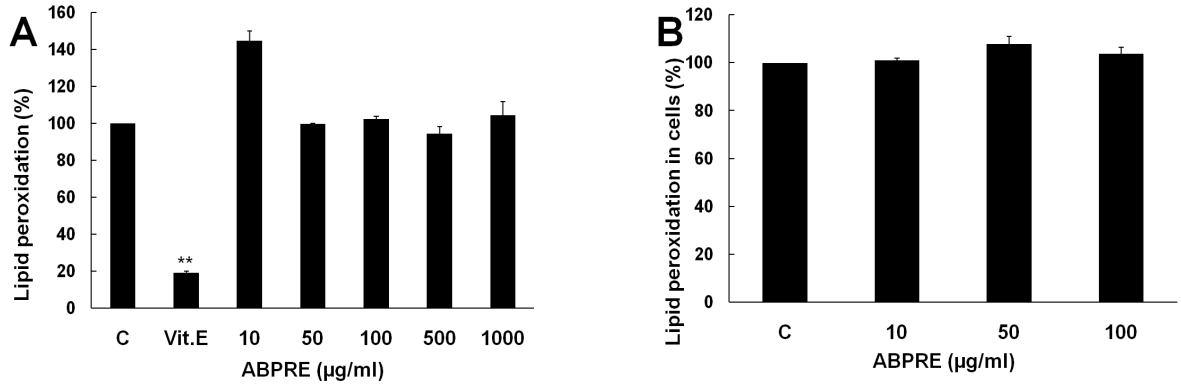

Fig. 2. Effect of ABPRE on lipid peroxidation *in vitro*. Vitamin E as a positive control was investigated at 1,000 μg/ml. To test antioxidant effect of ABPRE on lipid peroxidation, linoleic acid (A) was treated with ABPRE for 30 min (A), and B16F10 cells were treated with ABPRE for 1 hr (B). Lipid peroxidation was induced by fenton reaction. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$) using Student's t test.

의한 지질과산화를 확인하기 위하여 기존에 알려진 친유성 항산화제인 vitamin E의 지질과산화에 대한 억제효능을 관찰한 결과, Fig. 2A에서 보여지는 바와 같이 ABPRE 1,000 μg/ml 이하에서 지질과산화 효과를 관찰 할 수 없었으며 Fig. 2B에서 보는 바와 같이 세포 내에서 ABPRE의 지질 과산화에 대한 결과 또한 ABPRE 100 μg/ml 이하에서 지질과산화 억제 효과를 관찰 할 수 없었다.

Hydroxyl radical에 의한 DNA damage에 대한 ABPRE의 항산화 효과

쥐 흑색종 세포인 B16F10세포로부터 분리한 genomic DNA를 이용하여 Fenton반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 ABPRE의 항산화 효과를 조사하였다 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Fenton 반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 DNA가 노출되면 산화에 의해 DNA가 분해되었다. 반면, ABPRE를 10, 50, 100 μg/ml의 농도별로 처리한 군은 ABPRE의 농도가 증가함에 따라 DNA band가 선명해 지는 것으로 보아 ABPRE가 hydroxyl radical에 의한 genomic DNA의 산화적 손상이 유의성 있게 억제된다는 것을 알 수 있다.

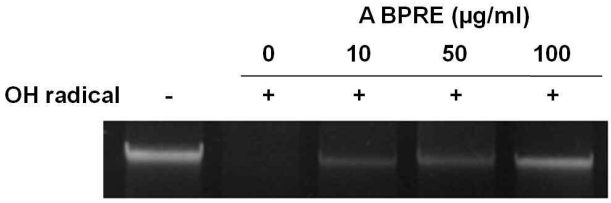

Fig. 3. Protective effect of ABPRE on DNA oxidative damage induced by hydroxyl radical. Genomic DNA purified from B16F10 cells were pre-treated with ABPRE for 1 hr exposed to •OH using Fenton reaction.

세포성장의 대한 ABPRE의 효과

ABPRE가 세포 독성에 미치는 농도를 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. B16F10 세포에 대한 ABPRE의 세포 독성을 측정한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 ABPRE 100 μg/ml 이하의 농도에서 대조군과 비교하였을 때 어떠한 독성 효과도 없는 것으로 나타났다.

세포 내 tyrosinase 활성 억제에 대한 ABPRE의 효과

Melanoma 세포에서 tyrosinase가 tyrosine을 기질로 하여 DOPA를 DOPA quinine으로 산화시킴으로써 멜라닌이 합성된다. B16F10 세포에서 ABPRE로 멜라닌 생성의 억제를 알아보기 위하여 ABPRE를 B16F10 세포에 각 농 도별로 처리하고

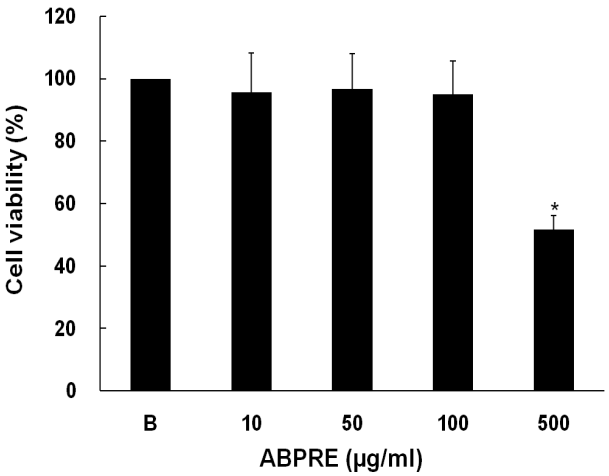

Fig. 4. Effect of ABPRE on viability of melanoma cells. B16F10 cells were treated with ABPRE at 10, 50, and 100 μg/ml and cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. ABPRE below 100 μg/ml did not exert any cytotoxic effect on B16F10 cells ($p<0.05$).

세포 내 tyrosinase 활성을 조사한 결과 Fig. 5에서 나타난 것과 같이 ABPRE의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제 효과가 증가 하였고 100 μg/ml에서 Arbutin보다 ABPRE이 tyrosinase 활성 억제 효과가 더 뛰어난 것으로 나타났다.

PMS로 자극된 B16F10 세포에서 MMP-2 and MMP-9 활성에 대한 ABPRE의 효과

본 실험에서 ABPRE의 항산화 효과에 의해 MMP-2와 MMP-9이 조절되는 지를 알아보기 위해 B16F10세포에 ABPRE를 처리한 후 superoxide anion-generating agent인 PMS (phenazine methosulfate)로 자극하여 72 hr 동안 배양 후 세포배양 상등액을 이용하여 gelatin zymography를 수행하였다. PMS는 세포 내에서 H_2O_2을 생성시켜 pro-MMP-2의 활성을 조절한다고 알려진 물질이다. Fig. 6A에서 보는 바와 같이 ABPRE의 농도가 100 μg/ml에서 MMP-2와 MMP-9의 발현과 활성이 억제되는 것으로 나타났다.

B16F10 세포에서 MMPs 및 항산화 효과와 관련된 단백질의 발현에 대한 ABPRE의 효과

ABPRE가 항산화 효소의 발현을 조절하는데 가장 중요한 전사인자인 Nrf2와 널리 알려진 항산화 효소의 단백질 발현을 조사하였다. Fig. 7A에서 보는 바와 같이 ABPRE는 10 μg/ml 이상의 농도에서 세포 내 항산화에 중요한 역할을 한다고 알려진 Nrf2와 SOD-1와 SOD-2의 단백질 발현을 증가시켰다. 또한 tyrosinase의 발현이 ABPRE 10 μg/ml 이상에서 억제됨이 관찰되었다. Fig. 7B 에서 보여지는 바와 같이 ABPRE는

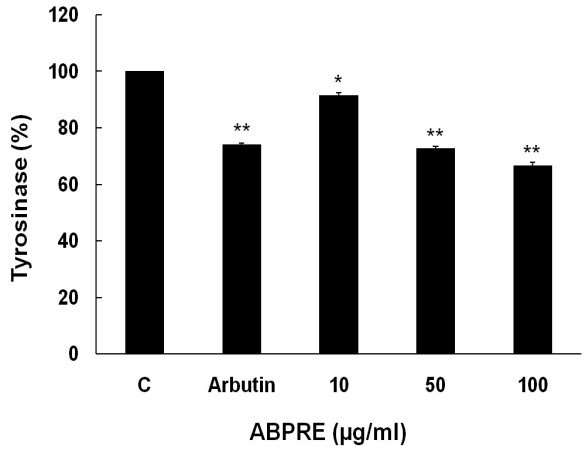

Fig. 5. Inhibitory effect of ABPRE on tyrosinase activity stimulated by L-DOPA. B16F10 cells were treated with ABPRE at 10, 50 and 100 μg/ml for 24 hr. Tyrosinase activity was measured by melanin production calculated with absorbance at 490 nm. Arbutin was used as a positive control. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$) using Student's t test.

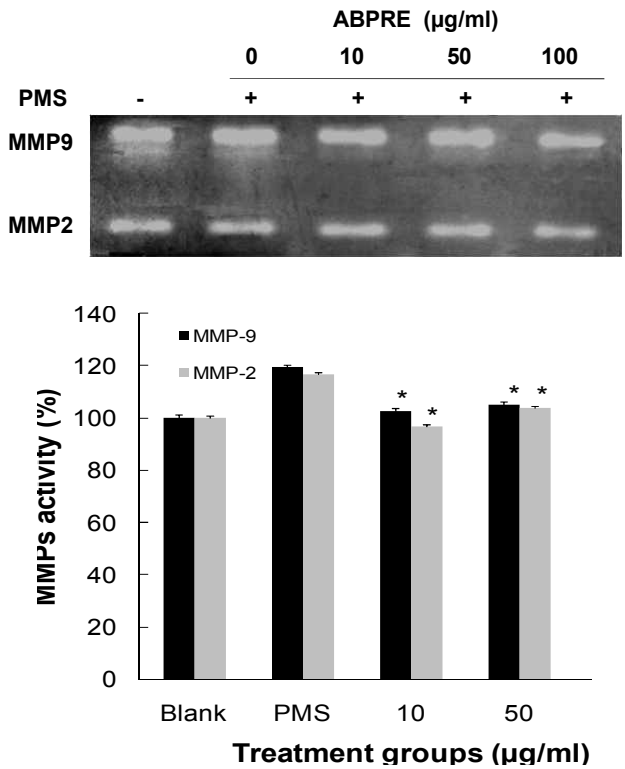

Fig. 6. Effect of ABPRE on activities of MMP-2 and -9 with PMS. B16F10 cells stimulated with 2 μM PMS to induce MMPs expression were treated with ABPRE at 10, 50 and 100 μg/ml under serum-free conditions for 72 hr. MMP-2 and -9 activities in conditioned media were determined by gelatin zymography. Values are expressed as relative MMPs activities using the following equation. Relative MMPs activity (%) = (intensity of a band/total intensity of blank band) ×100. Data are given as means of values±S.D. from three independent experiments.

PMS 처리군에서는 MMP-2 단백질 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 그러나 PMS에 의하여 증가된 MMP-2의 단백질의 발현 수준이 10 μg/ml 농도 이상의 ABPRE에 의해 뚜렷하게 억제되는 것으로 나타났다. 그러나 ABPRE에 의한 MMP-9의 단백질 발현은 억제되지 않은 것으로 나타났다.

고 찰

자외선이나 다양한 외부의 산화적 스트레스 및 인체 내 여러 가지 효소 반응에 의하여 활성산소종(O_2, H_2O_2, •OH)이 생성되고 이들 활성산소종은 단백질의 SH기와 반응하여 효소의 활성을 상실시키고 가교 결합의 촉진, DNA, RNA, 효소 및 세포막과 세포 소기관의 손상을 일으켜 세포사 유발 뿐만 아니라[15] 노화를 유발시키는 것으로 보고되어 있으며[13], 이러한 이유로 활성산소에 대한 연구가 관심의 초점이 되고 있으며, 가장 잘 알려진 활성산소종을 제거할 수 있는 항산화제로 vitamin E (α-tocophrol), vitamin C (ascrorbic acid),

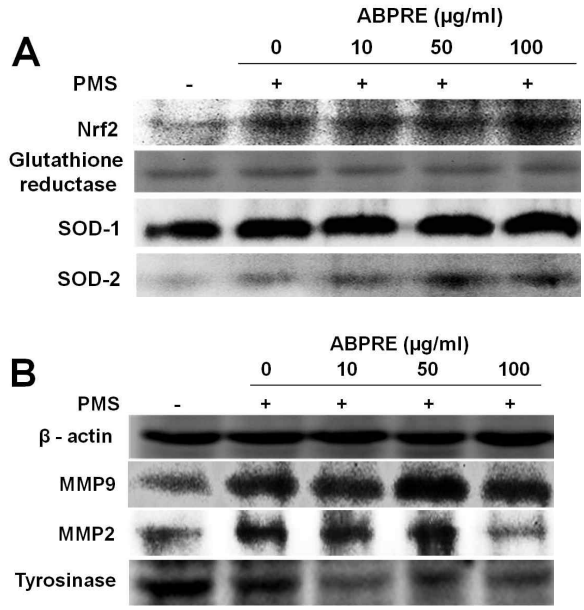

Fig. 7. Western blot analysis of protein expressions of MMP-2 and -9, Nrf2, SOD-1 and -2 and glutathione reductase in B16F10 cells. Cells were treated with ABPRE at 10, 50 and 100 μg/ml prior to stimulation of cells with 2 μM PMS for 24 hr. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated.

BTH (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole) 등이 있다[12]. 그러나 이들 중 항산화 효과가 뛰어난 BHT와 BHA는 돌연변이 유발과 안전성의 문제로 독성이 있어[4] 비교적 신체에 안전하게 섭식할 수 있는 천연 항산화제를 식물성 성분으로부터 개발하기 위한 연구가 시행되고 있는 중이다. 식물추출물은 phenolic compounds, vitamin C, carotenoids 등과 같은 항산화 물질을 많이 함유하고 있어 암, 심혈 관계 질환, 당뇨 등과 같은 만성질환 유발 위험을 줄일 수 있는 것으로 알려져 있다.

도라지(*Platycodon radix*)는 triterpenoid계 saponin과 당질, 섬유질을 함유하고 있어 한방에서는 배농, 거담, 기관지염 및 천식 등의 호흡기계 질환의 생약재로 이용되고 있으며, 그 약리 효과를 높이기 위해 도라지를 숙성, 발효시켜 흑도라지를 제조하였다. 그러나 흑도라지에 대한 연구가 미비하여 효능을 밝히고자 본 연구에서는 추출액인 ABPRE을 사용하여 먼저 항산화 활성을 측정하였다.

In vitro 실험 결과, ABPRE는 활성산소종인 DPPH, hydrogen peroxide, hydroxyl radical의 소거효과가 있는 것으로 나타났다. 그 중 DPPH radical의 효과가 탁월한 것으로 나타났으며 이러한 항산화 효과는 흑도라지에 함유되어 있는 사포닌에 의해 기인된 것으로 사료된다. 대두 사포닌은 혈청 cholesterol의 저하 및 각종 질병에 대한 면역 증강, 항암작용 및 항산화 효과가 크며, 인체 내 유해한 활성산소(superoxide: O_2^-)를 산소와 과산화수소(H_2O_2)로 분해할 수 있는 SOD (superoxide dismutase)활성을 높인다고 보고되어 있다[39].

항산화 기능에 의한 미백 효과를 알아보기 위해 멜라닌을 생성하는 세포인 쥐 흑색종 세포 B16F10 세포를 사용하여 본 연구를 진행하였다. 먼저 B16F10 세포에서 유래된 hydroxyl radical에 의한 DNA 보호 효과가 탁월한 것으로 확인되었다. 피부 미백에 도움을 주는 소재로 활용되는 vitamin C, 알부틴 등은 멜라닌이 합성되기 전 단계, 합성 중, 혹은 합성 이후 단계에 각각 작용하여 멜라닌 생성을 저해한다. Tyrosinase의 전사를 억제하는 물질들에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있다[33]. 최근에는 부작용이 없는 식물 추출물을 대상으로 미백소재를 찾기 위한 연구들이 활기를 띄고 있다 [24]. 강력한 항산화제로 알려진 vitamin C는 유해 활성산소 생성을 억제하고 콜라겐 합성을 촉진한다. 또한, 피부색소인 멜라닌 생성을 억제하며, 멜라닌 합성에 중요한 tyrosinase의 활성도 저해시킨다고 보고 되어있다[6,9,35,37].

이와 더불어 항산화에 중요한 전사인자인 Nrf2와 이것에 의하여 조절되는 SOD-1과 SOD-2, glutathione reductase의 발현 정도를 알아보기 위하여 western blot을 수행한 결과 ABPRE 농도에 따라 Nrf2, SOD-1 과 SOD-2의 단백질 발현이 증가되고, 더불어 tyrosinase는 감소됨이 관찰되었지만 glutathione reductase의 발현 정도는 변화가 없었다. 이는 B16F10 세포에서 ABPRE는 Nrf2, SOD-1과 SOD-2의 조절과 함께 tyrosinase 억제 효과에 의해 미백 효과가 있음을 알 수 있었다.

사람의 피부색은 melanin이나 카로틴과 같은 색소 성분과 혈관의 분포, 각 질층의 두께 등에 의해서 결정된다. 표피 기저층의 melanocyte에서 합성되는 melanin은 피부색을 결정하는 가장 중요한 요소로 자외선을 차단하는 기능을 갖고 있지만 이것이 국소적으로 과도하게 합성되거나, 멜라닌 생성에 이상이 발생하면 melasma, freckle 및 hyperpigmentation을 유발하게 된다[11]. 또한 멜라닌 세포의 악성화로 흑색종이 생기는 것으로 알려져 있으며, 이는 멜라닌세포가 존재하는 부위에서는 어디에서나 발생할 수 있으며, 피부에 발생하는 암 가운데 악성도가 가장 높다. 최초로 암 발생 장소에서 전이성을 가진 악성 암세포가 다른 새로운 조직으로 전이되어 이차종양을 형성하기 위해서는 이동 및 침윤, 혈관 신생 등의 일련의 과정을 동반하게 된다. 특히 암세포의 전이 단계는 세포 외 기질을 분해하는 과정이 반드시 필요하다[10,19].

그 중 가장 중요하게 작용하는 단백질 분해효소는 MMPs이며, 약 20 여종의 MMPs 중에서 type Ⅳ 콜라겐을 분해하는 MMP-2와 MMP-9이 각종 종양의 국소 침윤이나 전이과정에 관여 한다고 알려져 있다[40]. B16F10 세포에서 멜라닌 생성억제와 MMP-2와 MMP-9의 발현과 활성의 관련성에 대한 보고는 거의 없다. 항산화에 의한 MMPs의 활성을 알아보기 위하여 먼저 B16F10세포에 ABPRE를 처리한 다음 phenazine methosulfate (PMS)로 자극 후 상등액을 회수하여 gelatin zymography를 수행 하였다. PMS는 세포 내 에서 H_2O_2을 생성시켜 pro-MMP-2의 활성을 조절한다고 알려진 물질이다[38].

본 연구 결과에서 보여주는 PMS에 의해 자극된 MMP-2와 MMP-9의 발현과 활성에 대한 gelatin zymography를 수행한 결과 ABPRE의 농도에 따라 MMP-2와 MMP-9 활성이 억제되는 것이 관찰되었다. 이 결과는 PMS에 의해 만들어진 H_2O_2를 ABPRE가 제거함으로써 MMP-2의 활성을 억제하는 것으로 생각된다. 이를 단백질 수준에서 MMP-2와 MMP-9의 발현을 알아 보는 western blot을 수행한 결과 MMP-2의 발현은 감소된 반면 MMP-9의 발현 변화는 미약 하였다. 현재의 연구결과로는 MMP-9의 발현변화와 활성 감소 관계는 분석되지는 않았으나 ABPRE에 함유된 미분석 성분이 특이적으로 MMP-9와 경쟁적 저해를 하는 가능성을 배제할 수 없다고 생각된다. 유사한 예로, curcumin이 MMP-2의 활성을 억제함으로써 B16F10 세포의 암전이 활성에 관여한다는 보고가 있다[1] MMP-2 활성 감소는 western blot 결과로 발현양의 감소와 관계가 있다고 생각되며, 또한 ABPRE에 함유된 미분석 성분에 의한 저해 역시 존재한다고 여겨진다.

결론적으로 본 연구에서 개발된 ABPRE는 항산화 효과뿐만 아니라 tyrosinase의 활성을 억제함으로서 멜라닌 생성을 억제하여 미백 효과 물질로 가능성이 있으며, 또한 MMP-2와 MMP-9의 활성을 억제함으로써 암전이 억제 후보 물질로서 가능이 있다고 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2009년도 부산테크노파크의 연구비 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Banerji, A., J. Chakrabarti, A. Mitra, and A. Chatterjee. 2004. Effect of curcumin on gelatinase A (MMP-2) activity in B16F10 melanoma cells. *Cancer Letters* **211**, 235-242.
2. Bardia, A., I. Tleyjeh, J. Cerhan, A. Sood, P. Limburg, P. Erwin, and V. Montori. 2008. Efficacy of antioxidant supplementation in reducing primary cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysised.eds), pp. 23. Mayo Clinic.
3. Bjelakovic, G., D. Nikolova, L. Gluud, R. Simonetti, and C. Gluud. 2007. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* **297**, 842.
4. Branen, A. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **52,** 59-63.
5. Bystryn, J. 2000. Depigmentation other than vitiligo. Hann SK, Nordlund JJ. *Vitiligo* 243-246.
6. Chen, J., C. Wei, and M. Marshall. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39,** 1897-1901.
7. Choi, C., S. Kim, S. Hwang, B. Choi, H. Ahn, M. Lee, S. Park, and S. Kim. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science (Limerick)* **163,** 1161-1168.
8. Choi, C., E. Song, J. Kim, and M. Kang. 2003. Antioxidative activities of Castanea crenata Flos. methanol extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology* **35,** 1216-1220.
9. Chun, H., E. Choi, S. Yoon, H. Nam, S. Baek, and W. Woo. 2001. Inhibitory effects of ethanol extract of atractylodis Rhizoma alba on melanin biosynthesis. *Journal Pharmaceutical Society of Korea* **45,** 269-275.
10. Curran, S. and G. Murray. 2000. Matrix metalloproteinases molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *European Journal of Cancer* **36,** 1621-1630.
11. Curto, E., C. Kwong, H. Hermersdorfer, H. Glatt, C. Santis, V. Virador, V. Hearing, and T. Dooley. 1999. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology* **57,** 663-672.
12. Dziezak, J. 1986. Preservatives: antioxidants. *Food Technol.* **40,** 94-102.
13. Halliwell, B., O. Aruoma, and M. Davies. 1993. in DNA and free radicals, Ellis Horwood Chichester, UK. 109-144.
14. Hansen, M., S. Nielsen. and K. Berg. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods* **119,** 203-210.
15 Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11,** 298-300.
16. Imai, J., N. Ide, S. Nagae, T. Moriguchi, H. Matsuura, and Y. Itakura. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Medica* **60,** 417-420.
17. Kim, K., O. Ezaki, S. Ikemoto, and H. Itakura. 1995. Effects of Platycodon grandiflorum feeding on serum and liver lipid concentrations in rats with diet-induced hyperlipidemia. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **41**, 485-485.
18. Li, H. et al. 2000. Green tea polyphenols induce apoptosis *in vitro* in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Cancer Science* **91,** 34-40.
19. McCawley, L. and L. Matrisian. 2000. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Molecular Medicine Today* **6,** 149-156.
20. Milne, L., P. Nicotera, S. Orrenius, and M. Burkitt. 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **304,** 102-102.
21. Nagai, M., T. Ando, N. Tanaka, O. Tanaka, and S. Shibata. 1972. Chemical studies on the oriental plant drugs. XXVIII. Saponins and sapogenins of ginseng: Stereochemistry of the sapogenin of ginsenosides, Rb1, Rb2 and Rc. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **20,** 1212-1216.
22. Nah, S., K. Bhatia, J. Lyles, E. Ellinwood, and T. Lee. 2009. Effects of ginseng saponin on acute cocaine-induced alterations in evoked dopamine release and uptake in rat brain

nucleus accumbens. *Brain Research* **1248,** 184-190.
23. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* **44,** 307-315.
24. Park, J., Y. Shin, S. Baek, U. Lee, H. Chung, and Y. Park. 1997. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji* **41,** 518-523.
25. Pugliese, P. 1998. The skin's antioxidant systems. *Dermatology Nursing* **10,** 401-418.
26. Raju, J. and R. Mehta. 2009. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutrition and Cancer* **61,** 27-35.
27. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989 Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY.
28. Sanchez-Ferrer, A., J. Neptuno Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Canovas, and F. Garcia-Carmona. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochim. Biophys. Acta. **1247,** 1-11.
29. Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies. 1993. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Letters* **331,** 304-306.
30. Seifried, H., D. Anderson, E. Fisher, and J. Milner. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **18,** 567-579.
31. Sidwell, J. 1992. Food contact polymeric materials, iSmithers Rapra publishing
32. Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. Angewandte *Chemie International Edition in English* **25,** 1058-1071.
33. Stefania, B., C. Emanuela, and P. Mauro. 2003. Review: innovative technology, chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16,** 101-110.
34. Vile, G. and R. Tyrrell. 1995. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, 721-730.
35. Yang, M., M. Kim, S. Lim, H. Ann, and R. Ahn. 1999. Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *Journal Pharmaceutical Society of Korea* **43,** 494-501.
36. Yang, Y., Y. Kim, and H. Chung. 2001. Peroxynitrite and Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Dihydroxybenzaldehydes. *Korean Journal of Gerontology* **11**, 24-28
37. Yi, W., X. Wu, R. Cao, H. Song, and L. Ma. 2009. Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants. *Food Chemistry* **117**, 381-386.
38. Yoon, S., S. Park, S. Yoon, C. Yun, and A. Chung. 2002. Sustained production of H_2O_2 activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277,** 30271-30282.
39. Yoshiki Y., M. Kinumi, T. Kahara, and K. Okubo. 1996. Chemiluminescence of soybean saponins in the presence of active oxygen species. *Plant Science* **116**, 125-129.
40. Zeng, Z., A. Cohen, and J. Guillem. 1999. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* **20,** 749.

초록 : 쥐 흑색종 세포에서 산화적 스트레스에 의한 MMPs의 발현과 활성에 대한 흑도라지 추출물의 억제 효과

채용병 · 이수진 · 장호정[1] · 박정애[1] · 김문무 · 정경태[2]*
(동의대학교 화학과, [1]생명응용과학과, [2]임상병리학과 및 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원 센터)

도라지는 민간에서 항궤양, 항진통, 항알러지, 혈관과 히스타민 억제 및 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 그 뿌리인 길경은 아시아에서 식용으로 즐겨먹는 식품 소재로 사포닌이 과량 함유되어 있는 것으로 보고 되어 있으나, 그 작용기전은 과학적으로 해명되지 않았다. 본 연구에서 처음으로 흑도라지가 특정한 공정기술을 이용하여 개발되었으며, 산화적 스트레스 및 MMPs) 대한 ABPRE의 억제 효과를 조사하였다. ABPRE의 항산화 효과를 조사하기 위해서 DPPH radical, hydroxyl radical, reducing power, hydrogen peroxide, lipid peroxidation 및 DNA 산화에 대한 연구를 수행하였다. 연구 결과 ABPRE는 DPPH radical 소거에는 효과를 나타내었으나 지질과산화에 의한 malondialdehyde의 생성은 억제하지 않았다. 그러나, ABPRE의 존재 하에서 산화적 DNA 손상이 억제되었다. 또한 gelatin zymography 및 western blot 분석에서 ABPRE는 PMS (phenazine methosulfate)에 의해서 자극된 MMP-2의 발현과 활성을 감소시켰으며, ABPRE는 항산화 효과 및 tyrosinase 발현 억제에 의한 L-DOPA로 유발된 melanin 생성을 저해 하였을 뿐만 아니라 Nrf2에 의해서 조절되는 항산화 효소인 SOD-1과 SOD-2의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 그러므로 ABPRE는 항산화와 관련 있는 암전이의 예방을 위한 항암제의 후보 소재로 그 가능성이 기대된다.