

Effect of *Schizandra chinensis* Extracts on Oxidative Damage

Young Mi Park¹, Jae Hwan Lim¹, Hyung Jin Jeong² and Eul Won Seo^{1,†}

¹Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 760-749, Korea

In this study, we evaluated the protective effects of supercritical extracts and two step ethanol extracts after supercritical extraction from *Schizandra chinensis* on antioxidant activities and oxidative DNA and cell damages. Supercritical extracts removed DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical by 85.5% at 200 µg/ml, but showed low activities of scavenging and chelating the hydroxyl radical and ferrous iron. However, two step ethanol extracts showed low activities of scavenging the DPPH radical, but removed the hydroxyl radical by 86% at 200 µg/ml. In addition, we tested the activities of extracts for reducing hydroxyl radical-induced DNA and cell damage. Two step ethanol extracts showed protective effect against the oxidative DNA damage by reducing DNA segmentation, inhibiting DNA migration and decreasing the expression of phospho-H2AX. Also, two step ethanol extracts showed protective effect against the oxidative cell damage by inhibiting lipid peroxidation and increasing the expression of p21 protein. Taken together, we suggest that two step ethanol extracts from *S. chinensis* have a role as useful inhibitors against oxidative damages.

Key Words: *Schizandra chinensis*, Hydroxyl radical, Antioxidant activity, Oxidative stress

서 론

산업화로 인해 발생하는 다양한 공해물질에 대한 지속적인 접촉을 피할 수 없는 현대인의 환경조건에서는 각종 활성산소가 체내에 축적될 기회가 많을 뿐 아니라, 생체 내 산소 라디칼 반응은 생체조직의 노화나 악성종양을 비롯한 성인병 발병의 원인이 되고 있다 (Wiseman, 1996). 산소를 소비하여 에너지를 획득하는 호기성 유기체들은 산소에 의한 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있으며 이러한 산화적 스트레스는 정상적인 경우 생체 내에 존재하는 항산화계에 의해 제거된다. 그러나, 산업화 이후 날로 증가하는 각종 환경오염물질, 흡연, 알코올 및 방사선 등은 인류에게 산화적 스트레스를 가중시키고 있어 인체 내에 존재하는 항산화계의 역할만으로는 산화적 스트레스에 의해 야기될 수 있는 손상을 적절히 방어하지 못하고 있다 (Gutteridge and Halliwell, 1994). 산화적

스트레스가 제거되지 않으면 생체막의 손상, 고분자 단백질 및 DNA의 변형과 기능상실 등으로 인한 다양한 퇴행성 질환이 유발될 수 있으므로 산화적 스트레스와 이로 인해 유발되는 건강 문제를 해결할 수 있는 물질로서 항산화제에 대한 관심이 집중되고 있다. 그러나 현재까지도 이들 성인병의 치료에는 한계가 있으므로 항산화 효과가 풍부한 식품을 일상적으로 섭취함으로써 이들 식품구성 성분의 생체조절기능에 대한 효과를 병행하는 방법 등이 다양하게 검토되고 있는 실정이다 (Miquel et al., 1989). 일반적인 항산화제는 지질과산화 작용의 억제, DNA 손상 회복, 노화 억제, 식품 품질 유지 등의 기능을 갖고 있어 다양한 용도로 사용되고 있으나, 합성 항산화제의 안전성 문제가 제기되고 있어 효능이 우수하고 안전성 면에서 입증된 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구들이 수행되고 있다 (Kim, 2004). 특히 식물체는 광합성 과정에서 활성산소가 많이 생성되므로 활성산소로부터 보호할 수 있는 효소와 2차대사산물의 방어체계가 발달되어 있기 때문에 식물의 항산화물질에 관한 연구들이 이루어지고 있다 (Frankel, 1996).

오미자 (*Schizandra chinensis* Baillon)는 목련과에 속한 낙엽 목질 등본으로 원산지는 한국이며, 일본과 중국에도 분포한다. 오미자는 중추신경 흥분 억제 작용, 진정 진통

*접수일: 2011년 2월 7일 / 수정일: 2011년 3월 10일
채택일: 2011년 3월 19일

†교신저자: 서울원, (우) 760-749 경북 안동시 송천동 388, 안동대학교 자연과학대학 생명과학과
Tel: 054-820-5462, Fax: 054-820-7705
e-mail: ewseo@andong.ac.kr

작용, 간기능 보호 작용, 당대사 촉진 작용, 항균 작용, 항궤양 작용, 혈관 확장 작용, 항노화 작용, 거담 진해 작용이 있는 것으로 알려져 있는 생약재로서 암예방, 노화 억제 및 면역조절 작용 등 다양한 생리적 기능이 보고되어 있다 (Rho and Oh, 2002; Kim and Suh, 2005). 오미자의 성분으로는 schizandrin, schizandran, γ -schizandrin, ethamigrenal, gomisin류 등이 보고된 바 있다. 이 중에서도 특히 schizandrin의 경우 혈당저하 작용, 항궤양 작용, 만성간염 치료 효과, 중추신경흥분작용이 있는 것으로 알려져 있으며 gomisin류는 항산화 작용을 나타낸다고 알려져 있지만, 오미자의 항산화 효과 및 DNA와 세포의 산화적 손상 억제 효과에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 오미자의 다양한 의약품 소재, 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성을 모색하고자 오미자의 초임계 추출물과 초임계 후 에탄올 추출물의 항산화 효과 및 DNA와 세포의 손상에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 오미자 (*Schizandra chinensis*)는 문경 지역에서 재배, 수확되어 건조된 것을 성공오미자농원에서 구입하여 공시료로 사용하였다.

실험 시약

NIH 3T3 세포는 한국세포주은행 (KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양받았고, 세포의 배양을 위해 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)과 소태아혈청 (FBS), 인산완충식염수 (PBS) 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. Ψ X-174 RF I plasmid는 New England BioLabs (County Road Ipswich, MA)에서 구입하였고, western blot에 사용한 항체는 Santacruz에서 구입하였다. 그 외에 실험에 사용된 용매 및 시약은 특급을 사용하였다.

시료 추출

초임계 추출은 경북 안동시에 소재하는 경북바이오산업연구원에 설치되어 있는 초임계 추출 장치 (JASCO Corporation, Japan)를 사용하여 추출하였다. 초임계 유체 유출 장치에서 250 bar로 가압하였으며, 5시간 동안 추출하였고, CO₂의 유속은 3 ml/min로 설정하여 추출물은 메

탄올로 포집하였다. 초임계 추출 장치에 의해 추출된 시료는 정제수와 butylene glycol이 7:3으로 혼합되어 있는 용액에서 용해시킨 후, 재차 24시간 동안 40°C 항온기에 보관하여 완전히 용해시킨 다음 0.45 μ m 필터를 이용하여 여과하였다. 여과 후 시료는 밀봉하여 4°C에서 보관하였다. 초임계 후 에탄올 추출은 초임계 후 남은 오미자 100 g에 1,000 ml의 70% 에탄올을 혼합하여 25°C에서 총 3회 환류 추출을 한 후 Whatman No. 2로 여과하였다. 여과한 추출액은 농축하여 petroleum ether와 ethyl acetate로 총 5회 분획을 하였으며 ethyl acetate 혼합액은 sodium sulfate 처리하여 24시간 상온에서 반응시킨 후 건조하였다. 건조한 추출물은 밀봉한 후 -70°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

오미자 추출물의 항산화 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 제거 활성은 Hsu 등 (2006)의 방법에 따라 측정하였다. 오미자 추출물은 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 사용하여 0.32, 1.6, 8, 40, 200 μ g/ml로 희석하였으며, 농도별 추출물 40 μ l와 300 mM DPPH 760 μ l을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수산화 라디칼 제거 활성은 Smirnoff와 Cumbes (1989)의 방법에 준하여 수행하였다. 250 μ l의 FeSO₄, 175 μ l의 H₂O₂를 75 μ l의 농도별 추출물과 잘 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fe²⁺-chelating 활성 분석은 Hsu 등 (2006)의 방법을 수정하여 실행하였다. 2 mM FeCl₂ 15 μ l와 시료 150 μ l, 5 mM ferrozine 30 μ l, 605 μ l의 증류수를 혼합하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 562 nm에서 Fe²⁺-ferrozine 혼합 용액의 흡광도를 측정하였다. 각 실험 항목에서 농도에 따른 추출물의 항산화 활성은 다음의 식으로 %를 계산하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가군의 흡광도} / \text{추출물 무첨가군의 흡광도})\} \times 100$$

오미자 추출물의 산화적 DNA와 세포에 대한 손상 억제력

오미자 추출물의 산화적 DNA 손상 억제력을 조사하기 위하여 우선 팔 열수 추출물이 Ψ X-174 RF I plasmid DNA 손상에 미치는 영향을 조사하였다. Ψ X-174 RF I plasmid DNA 5 μ l와 농도별 시료 10 μ l를 처리하여 1 mM FeSO₄와 H₂O₂를 각각 5 μ l씩 섞어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 50% glycerol (v/v), 40 mM EDTA, 0.05%

bromophenol blue을 첨가하여 reaction stop buffer를 만들어 잘 혼합하였다. 혼합 후 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel로 전기영동 후 분석하였다. DNA tail 이동도 분석은 Cho 등 (2008)의 실험방법에 준하여 시행하였다. NIH 3T3 세포 (2×10^6 cells/well)를 약 16시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 배양 후 시료를 처리하여 24 시간 반응시킨 다음 회수하였으며, 회수한 세포는 50 µl lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM DTT)와 0.2 mg proteinase K를 혼합하여 50°C에서 약 1시간 처리하였다. 그 후 1 mg/ml의 RNase 10 µl를 첨가한 다음 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동 하였다.

또한 오미자 추출물이 수산화 라디칼에 의한 DNA의 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 H2AX 인산화비를 조사하였다. 시료를 처리한 NIH 3T3 세포로부터 lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출한 후 PVDF membrane에 transblot 하였다. Transblot 후 membrane에 H2AX 항체와 완충액 (5% BSA, 1×TBST)을 1:1,000으로 하여 4°C에서 반응시킨 후 HRP-linked antibody를 처리하여 오미자 추출물의 처리에 따른 H2AX의 인산화비를 조사하였다. 오미자 추출물이 산화적 세포 손상에 대한 억제 활성을 조사하기 위해서 우선 MTT assay를 실시하였다. NIH 3T3 세포를 37°C에서 24시간 배양 후, 시료와 10 mM FeSO₄ 10 µl를 처리하여 30분 반응시킨 다음 10 mM H₂O₂ 10 µl를 처리하여 배양하였다. 배양 후 50 µl의 MTT (1 mg/ml) 용액을 처리하여 4시간 반응시켰으며 상등액을 제거한 다음 DMSO 100 µl를 각각 처리하였고, microplate reader (infinite 200, Austria)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지질과산화능 분석은 Kang 등 (2008)의 방법에 따라 시행하였다. 시료를 처리한 NIH 3T3 세포 (2×10^5 cells/ml)를 1.15% KCl로 균질화시킨 후 0.2 ml sodium dodecyl sulfate (8.1%), 1.5 ml acetic acid (20%, pH 3.5) 및 1.5 ml thiobarbituric acid (0.8%)를 첨가하여 고온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 5 ml n-butanol/pyridine mixture (15:1, v/v)로 분획을 통해 얻은 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

이와 더불어 오미자 추출물의 산화적 세포 손상에 대한 억제능을 확인하기 위해 p21 단백질의 발현율을 조사하였다. NIH 3T3 세포에 오미자 추출물을 처리하여 24 시간 배양한 후 균질화하였으며 12,000 rpm에서 15분 동

안 3회 원심분리하여 단백질을 추출하였다. Western blot은 15% SDS-PAGE에서 전기영동한 후 transblot 하였고, p21 단백질에 대한 항체를 1:1,000으로 하여 p21 단백질의 발현을 확인하였다.

통계처리

모든 실험은 독립적으로 5회 이상 반복적으로 이루어졌으며 결과에 대한 통계처리는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's t-test를 이용한 후 P 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 해석하였다.

결과 및 고찰

오미자 추출물의 항산화 활성

본 연구에서 용매별 오미자 추출물의 항산화 활성을 분석하기 위하여 DPPH 유리 라디칼과 수산화 라디칼 제거능을 조사하였다. DPPH 유리 라디칼 제거능의 경우 오미자 초임계 추출물은 0.32 µg/ml에서 0.6%, 1.6 µg/ml에서 25.0%, 8 µg/ml에서 84.1%, 40 µg/ml에서 85.2%, 200 µg/ml에서 85.5%로 처리 농도가 높아짐에 따라 제거 활성이 점차 증가하였다. 반면 초임계 후 에탄올 추출물도 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 제거능이 증가하였으나 0.32 µg/ml에서 2.09%, 1.6 µg/ml에서 13.54%, 8 µg/ml에서 15.74%, 40 µg/ml에서 17.64% 200 µg/ml에서 34.04%의 활성을 보여 초임계 추출물에 비해서 다소 낮은 DPPH 라디칼 제거 효과를 가지는 것으로 조사되었다 (Fig. 1A).

이와 더불어 수산화 라디칼 제거능을 분석해 보면, 초임계 추출물의 라디칼 제거능은 0.32 µg/ml에서 1.93%, 1.6 µg/ml에서 3.77%, 8 µg/ml에서 5.66%, 40 µg/ml에서 13.54%, 200 µg/ml에서 44.90%의 라디칼 제거 활성을 나타내고 있다. 또한 초임계 후 에탄올 추출물도 농도가 높아짐에 따라 수산화 라디칼 제거 활성이 증가하여 0.32 µg/ml에서 1.70%, 1.6 µg/ml에서 10.17%, 8 µg/ml에서 23.85%, 40 µg/ml에서 31.79% 그리고 200 µg/ml의 농도에서 86.51%로 나타나 초임계 추출물에 비해 높은 활성을 보이고 있다 (Fig. 1B).

오미자 물 추출물의 경우 DPPH 유리 라디칼과 수산화 라디칼의 제거능은 250 µg/ml의 농도에서 각각 52.7%, 46.2%의 활성을 보인다고 하였는데 (Kim and Choi, 2008), 본 연구에서 DPPH 라디칼 제거능은 초임계 추출물이 높은 활성을 보였지만, 수산화 라디칼 제거능은 초임계 후 에탄올 추출물이 높은 활성을 가지는 것으로 조사되

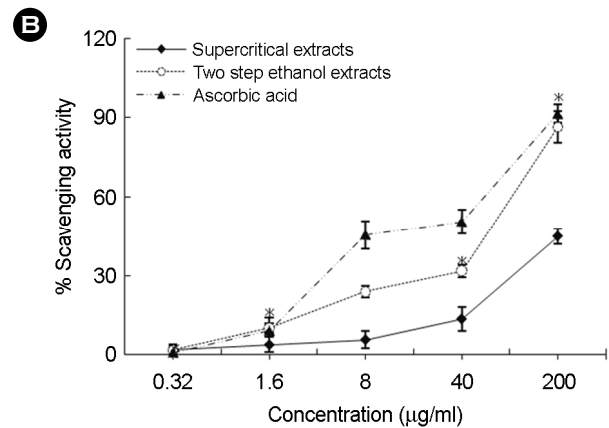
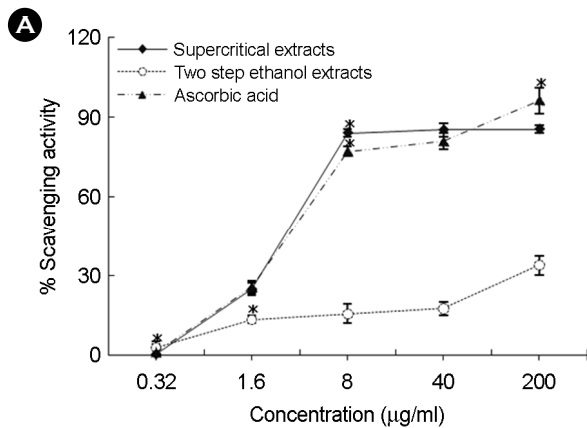


Fig. 1. (A) DPPH free radical and (B) hydroxyl radical scavenging activities of supercritical and two step ethanol extracts from *S. chinensis*. The absorbance values were converted to scavenging effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging effect (%) values \pm S.D. (n=5) against extracts concentration in μ g extracts per ml reaction volume. Ascorbic acid was used for the positive control. * P <0.05 indicates a significant difference between the control and each extract.

었다. 따라서 오미자의 초임계 후 에탄올 추출물이 초임계 추출물에 비해 유리 라디칼의 제거에 효과적으로 작용할 것으로 생각된다.

철은 생체의 성장과 발달에 중요한 미량 무기질 영양소로써 산소 운반 및 에너지 대사에 필수적인 성분이다 (Lee and Park, 2005). 그러나 Fe^{3+} 는 반응성이 큰 활성산소에 의해 환원되면 과산화수소를 전이시켜 수산화 라디칼을 생성한다. 이에 따라 항산화제의 역할은 크게 금속 이온의 착염화 기능, superoxide dismutase (SOD)와 같은 활성물질에 의한 유리 라디칼의 포집력으로 라디칼 반응을 종결시키는 것으로 보고되고 있다 (Chan et al., 1994). 따라서 Fe^{2+} 이온에 대한 chelating 효과는 Fenton 반응에 의한 유리 라디칼의 생성 억제 여부를 알 수 있다. 본 연구에서 오미자 초임계 추출물의 Fe^{2+} -chelating 효과는 200 μ g/ml에서 17.44%로 다소 낮은 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 그러나 초임계 후 에탄올 추출물의 Fe^{2+} -chelating 효과는 0.32 μ g/ml에서 0.05%, 1.6 μ g/ml에서 0.1%, 8 μ g/ml에서 1.50%, 40 μ g/ml에서 12.63%, 200 μ g/ml에서 23.65%로 나타나 초임계 추출물에 비해 Fe^{2+} 의 환원력은 다소 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 2). 복분자 (*Rubus coreanus*) 물 추출물과 메탄올 추출물의 Fe^{2+} -chelating 효과는 물 추출물에서 2.71~7.37%, 메탄올 추출물에서 5.50~6.64%로 나타나 뚜렷한 활성을 보이지 않는다고 한 바 있는데 (Park and Chin, 2007), 본 연구에서도 Fe^{2+} -chelating 효과는 오미자의 초임계 추출물보다는 초임계 후 에탄올 추출물이 보다 효과적으로 작용하는 것으로 조사되어 복분자 추출물에 비해 비교적 높은

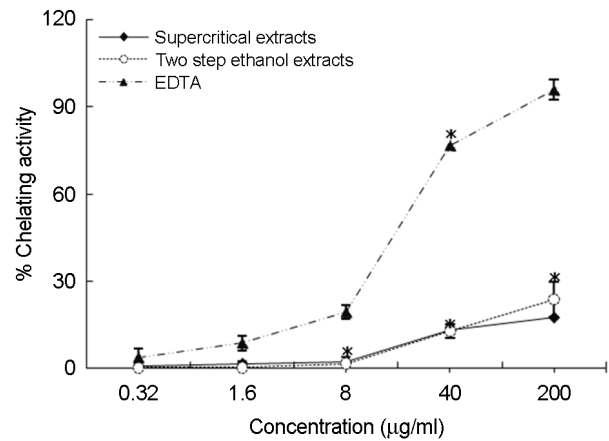


Fig. 2. Fe^{2+} -chelating activities of the supercritical and two step ethanol extracts from *S. chinensis*. The absorbance values were converted to scavenging effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging effect (%) values \pm S.D. (n=5) against extracts concentration in μ g extracts per ml reaction volume. EDTA was used for the positive control. * P <0.05 indicates a significant difference between the control and each extract.

chelating 효과를 보였다. 따라서 본 연구 결과 오미자의 초임계 후 에탄올 추출물은 초임계 추출물에 비해 유리 라디칼의 생성을 억제하는데 효과적일 것으로 생각된다.

오미자 추출물이 DNA의 산화적 손상에 미치는 영향

오미자 추출물이 활성산소에 의한 산화적 DNA 손상에 미치는 억제 효과를 알아보기 위해 Ψ X-174 RF I plasmid DNA를 이용하여 *in vitro* DNA 분절과 DNA tail 이동도 분석을 실시하였다. DNA에 유발된 산화적 손상의 축적은 정상세포를 형질전환세포로 전환시키는 발암 개시점으로

작용하기 때문에 항산화능에 있어 DNA의 산화적 손상에 대한 억제력은 매우 중요하다 (Vuillaume, 1987). 본 연구에서 무처리 대조군의 DNA는 supercoiled (SC) 형태를 나타내었으나 Fe^{2+} 와 H_2O_2 만 처리한 라디칼 처리군에서는 수산화 라디칼에 의한 DNA 분절화로 인해 open circular (OC) 형태의 DNA로 전환되었다. 이러한 조건에서 오미자 초임계 추출물을 처리한 실험군의 DNA의 산화적 손상 억제능은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 30.3%의 활성을 보였다 (Fig. 3A). 반면 초임계 후 에탄올 추출물을 처리한 실험군에

서 DNA 손상 억제능은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 40.1%의 활성을 보이고 있어 초임계 추출물에 비해 DNA 손상 억제 효과는 비교적 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 3B). 또한 DNA tail 이동도를 분석하여 본 결과, DNA tail 이동도는 무처리 대조군에 비해 Fe^{2+} 와 H_2O_2 만을 처리한 라디칼 처리군에서 훨씬 증가되는 경향을 보이고 있다. 이러한 조건에서 오미자의 초임계 추출물을 처리하였을 때 DNA tail은 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 라디칼 처리군과 비슷한 이동도를 나타내었으나 농도가 높아짐에 따라 이동도가 점차

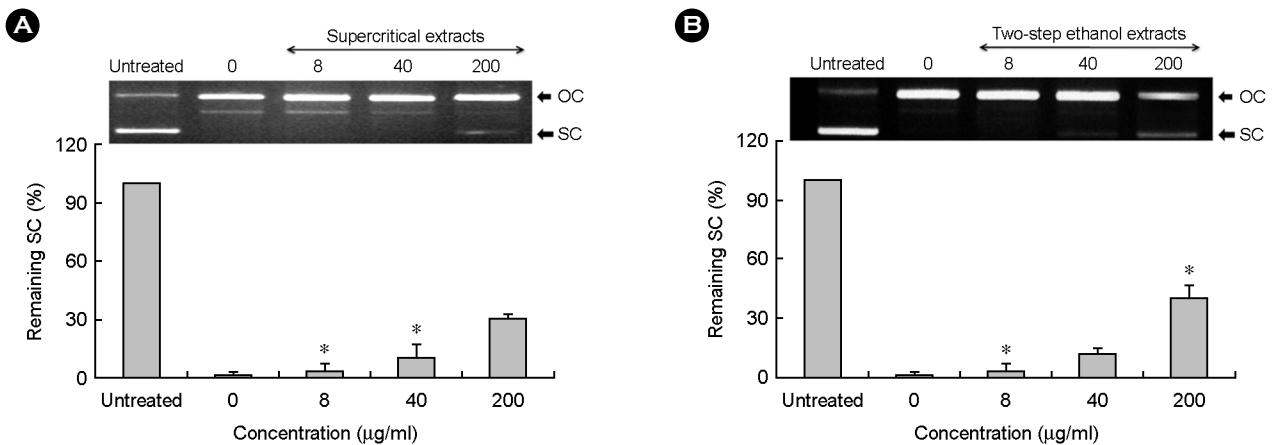


Fig. 3. Inhibitory effects of the (A) supercritical and (B) two step ethanol extracts from *S. chinensis* on oxidative DNA damage induced by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated, and lane 2 is treated with FeSO_4 and H_2O_2 without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extract (1.6, 8, 40 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The plot shows % inhibition of the extracts against the conversion of SC into OC induced by hydroxyl radical. % inhibition was calculated by the density using the software Un-SCAN-IT gel Version 5.1 (Silk Scientific, Inc.). * $P < 0.05$ indicates a significant difference between the untreated group and the treated group.

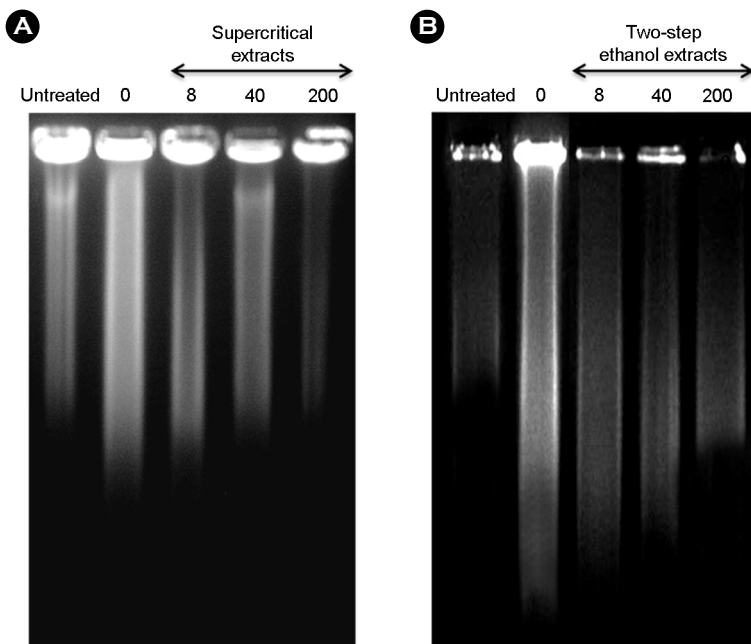


Fig. 4. Effect of the (A) supercritical and (B) two step ethanol extracts from *S. chinensis* on intracellular DNA migration assay of NIH 3T3 cells caused by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated, and lane 2 is treated with FeSO_4 and H_2O_2 without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extract (1.6, 8, 40 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

낮아졌으며 초임계 후 에탄올 추출물은 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 DNA tail의 이동도가 무처리 대조군 수준을 유지하고 있지만 처리 농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 극히 짧아지는 것으로 확인되었다 (Fig. 4).

Kim과 Park (2010)은 오미자의 아세톤 추출물로 DNA 손상을 유도한 결과 DNA tail의 이동도가 73.1%로 억제된 것으로 보아 오미자 아세톤 추출물이 과산화수소에 의해 유도되는 DNA 손상을 효과적으로 억제시키는 항유전 독성을 가지고 있다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 오미자의 초임계 추출물과 초임계 후 에탄올 추출물은 DNA에 대한 손상과 DNA tail 이동을 비교적 효과적으로 억제하는 것으로 보아 활성산소에 의한 DNA 분절화를 억제하는데 효과적으로 작용할 것으로 생각된다.

오미자 추출물이 수산화 라디칼에 의한 DNA의 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 H2AX의 인산화비를 분석하였다. DNA 이중나선의 분절은 히스톤 단백질의 변이 중 하나인 H2AX의 인산화로 인해 야기되는데, 이는 DNA의 손상을 알아보는 데 중요한 지표로 알려져 있다 (Redon et al., 2002; Barzilai and Yamamoto, 2004). H2AX의 인산화비는 Fe^{2+} 와 H_2O_2 만 처리한 라디칼 처리군에 대해 오미자 추출물을 처리하였을 때의 상대적인 인산화비로 분석하였다. 오미자의 초임계 추출물을 라디칼과 함께 처리하였을 때 H2AX의 인산화비는 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 88.6%, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 83.2%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 63.1%로 농도가 높아짐에 따라 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5A). 또한 초임계 후 에탄올 추출물의 H2AX 인산

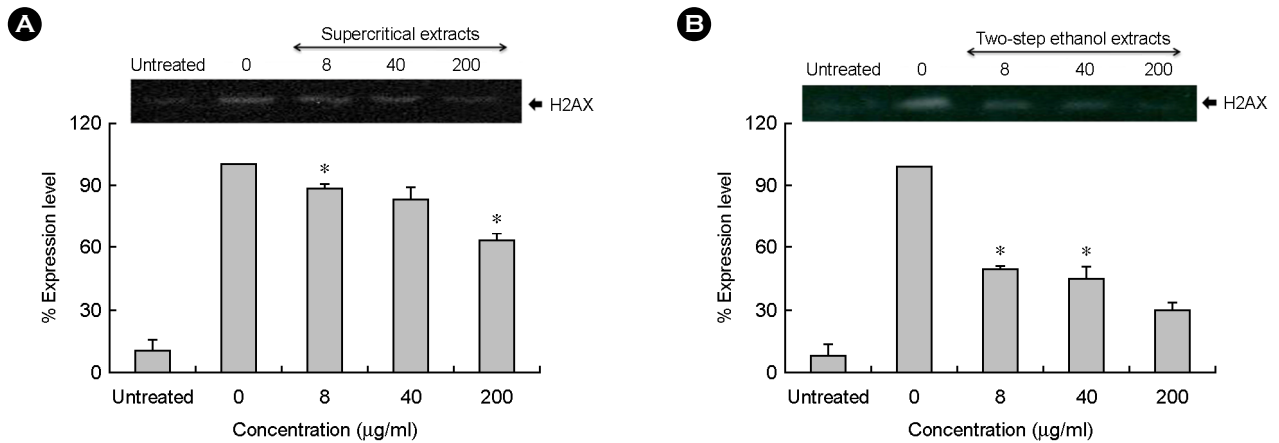


Fig. 5. Expression effect of (A) supercritical and (B) two step ethanol extracts from *S. chinensis* on H2AX induced by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated and lane 2 is treated with FeSO_4 and H_2O_2 without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extract (1.6, 8, 40 and 200 $\mu\text{g/ml}$). In the plot, % expression level was calculated by being compared with the density of the treated lane using UN-SCAN-IT program. * $P < 0.05$ indicates a significant difference between the untreated group and the treated group.

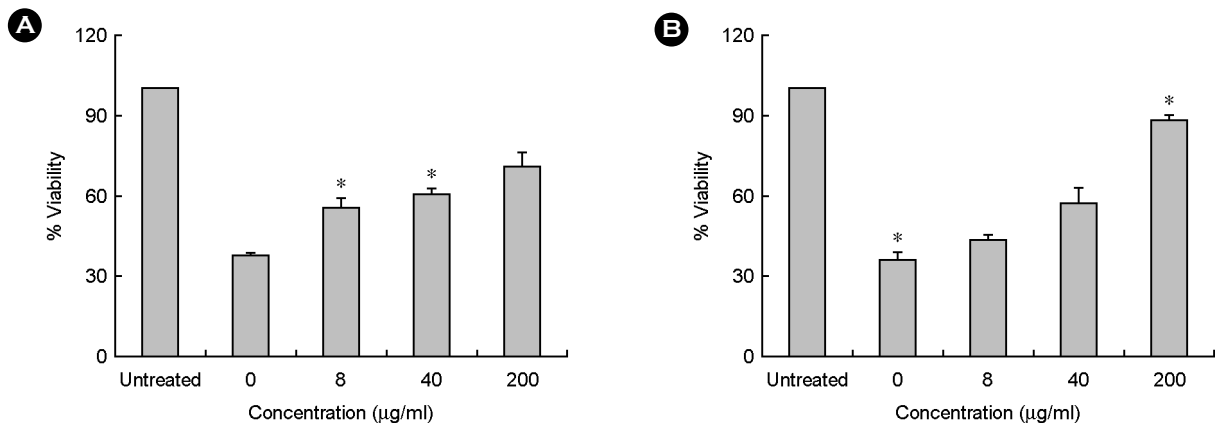


Fig. 6. Inhibitory effect of the (A) supercritical and (B) two step ethanol extracts from *S. chinensis* on oxidative cell damage induced by hydroxyl radical. The viability of NIH 3T3 cells was evaluated by a MTT assay. * $P < 0.05$ indicates a significant difference between the untreated group and the treated group.

화비는 처리 농도가 높아질수록 점차 감소하여 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50.0%, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 45.5%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 30.2%로 나타나 초임계 추출물에 비해 H2AX의 인산화비 억제 효과가 높았다 (Fig. 5B). 최근 Jeong 등 (2009)의 연구에 의하면 보리 (*Hordeum vulgare*) 씨앗에서 정제된 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 DNA에 대한 H2AX의 인산화비 억제율은 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 80%로 나타난다고 한 바 있다. 본 연구에서 초임계 추출물의 인산화비의 억제율은 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 36.9%로 나타나고 있으나, 초임계 후 에탄올 추출물에서는 농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 69.8%의 인산화비 억제율을 보이고 있기 때문에 오미자의 초임계 후 에탄올 추출물이 초임계 추출물에 비해 H2AX의 인산화를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

오미자 추출물의 산화적 세포 손상에 대한 억제 활성

오미자 추출물이 활성산소에 의해 야기되는 세포의 산화적 손상에 미치는 영향을 알아보기 위해 우선 MTT 분석을 통한 오미자 추출물의 세포 독성을 확인하였다. NIH 3T3 세포주를 대상으로 세포 생존율을 측정된 결과 Fe^{2+} 와 H_2O_2 만 처리한 라디칼 처리군은 무처리 대조군에 비해 세포의 생존율이 35~37%로 급격히 감소하였다. 이러한 조건에서 오미자 초임계 추출물을 처리하였을 때에는 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 55.6%, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 60.3%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 70.6%로 나타나 추출물의 처리 농도가 높아짐에 따라 세포의 생존율이 대조군의 생존율을 보였으며 (Fig. 6A), 초임계 후 에탄올 추출물을 처리한 경우에는 8 $\mu\text{g/ml}$ 에

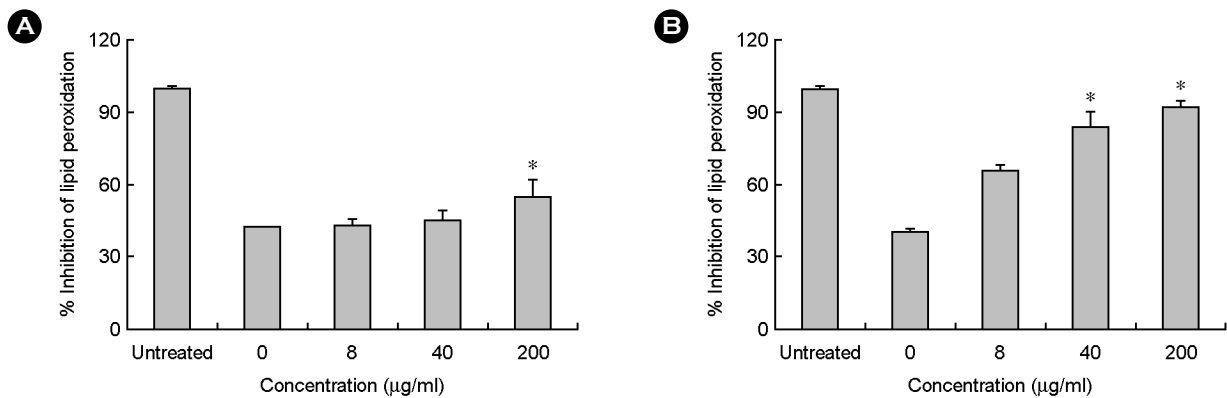


Fig. 7. The lipid peroxidation effect of the (A) supercritical and (B) two step ethanol extracts from *S. chinensis* on oxidative cell damage induced by hydroxyl radical. The inhibition of lipid peroxidation was evaluated by measuring the amount of TBARS formation using NIH 3T3 cells. * $P < 0.05$ indicates a significant difference between the untreated group and the treated group.

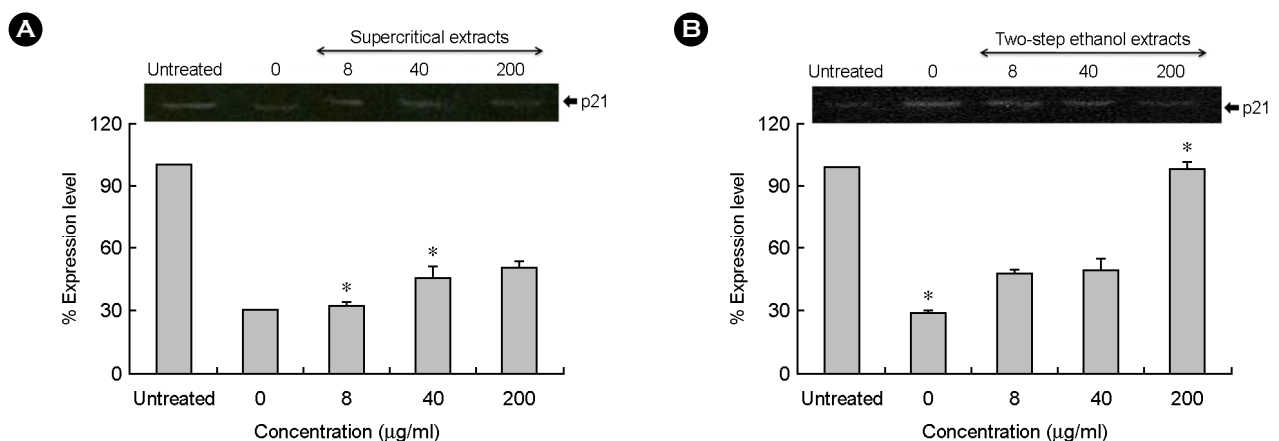


Fig. 8. Expression effect of the (A) supercritical and (B) two step ethanol extracts from *S. chinensis* on p21 protein induced by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated and lane 2 is treated with FeSO_4 and H_2O_2 without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extract (1.6, 8, 40 and 200 $\mu\text{g/ml}$). In the plot, % expression level was calculated by being compared with the density of the control band (untreated) lane using UN-SCAN-IT program. * $P < 0.05$ indicates a significant difference between the untreated group and the treated group.

서 43.2%, 40 µg/ml에서 57.1%, 200 µg/ml에서 88.1%로 나타나 초임계 후 에탄올 추출물의 처리 농도가 높아짐에 따라 세포의 생존율은 대조군의 생존율과 유사한 것으로 나타났다 (Fig. 6B).

또한 지질과산화 분석을 통하여 오미자 추출물이 수산화 라디칼에 의한 과산화물의 생성에 미치는 영향을 분석한 결과, 무처리 대조군에 비하여 라디칼 처리군의 지질과산화 억제 효과는 약 40%의 낮은 수치를 보였다. 반면 이러한 조건에서 오미자 초임계 추출물의 지질과산화 억제율은 8 µg/ml에서 43.3%, 40 µg/ml에서 45.1%, 200 µg/ml에서 55.3%로 점차 증가하는 경향을 보였으며 (Fig. 7A), 초임계 후 에탄올 추출물도 농도 의존적으로 억제 활성이 증가하여 농도 8 µg/ml에서 66.3%, 40 µg/ml에서 84.1%, 200 µg/ml에서 92.3%로 나타나 초임계 추출물에 비해 지질과산화 억제 효과가 큰 것으로 나타났다 (Fig. 7B).

Choi 등 (2003)은 항염증 및 항산화 활성을 알아보기 위해 오미자 에탄올 추출물의 지질과산화 억제 활성을 측정된 결과 linoleic acid와 phosphatidylcholine liposome 기질 모두에 대하여 70% 이상의 높은 억제 활성을 나타낸다고 한 바 있는데, 본 연구에서도 초임계 추출물과 초임계 후 에탄올 추출물은 농도 200 µg/ml에서 각각 55.3%, 92.3%의 지질과산화 억제 활성을 나타내고 있어 초임계 추출물에 비해 초임계 후 에탄올 추출물이 지질과산화와 2차 산화물의 생성을 억제하는 효과가 큰 것으로 생각된다.

p21 단백질은 p53에 의한 세포 성장 조절 과정 중의 중요한 하위 매개체로 세포 주기의 G1에서 S기로의 변화하는 과정에 작용한다 (Michieli et al., 1994). 따라서 오미자 추출물의 산화적 세포 손상에 대한 억제 활성을 조사하기 위해 p21 단백질의 발현율을 분석하였다. p21 단백질의 발현율은 무처리 대조군에 대해 오미자 추출물을 처리한 실험군의 상대적인 발현으로 분석하였는데, 본 연구에서 무처리 대조군에 비해 Fe²⁺와 H₂O₂만 처리한 라디칼 처리군의 p21 단백질 발현율은 약 30% 정도를 나타내었다. 이러한 조건에서 오미자 초임계 추출물을 처리한 경우 p21 단백질의 발현은 농도 의존적으로 증가하였으나, 200 µg/ml에서 50.3%의 발현율을 나타내었다 (Fig. 8A). 그러나 초임계 후 에탄올 추출물을 처리한 실험군에서 p21 단백질의 발현은 농도가 높아짐에 따라 p21 단백질의 발현율도 점차 증가하여 8 µg/ml에서 18.3%, 40 µg/ml에서 50.1%를 보였으며, 200 µg/ml에서는 99.1%의

발현율을 보였다 (Fig. 8B). 상황 보리 (*Phellinus linteus*)의 경우 추출물의 농도가 0~2.0 mg/ml로 높아짐에 따라 p21 단백질 발현이 증가함으로써 세포증식 억제에 따른 항암 작용을 나타낸다고 보고된 바 있는데 (Park et al., 2007), 본 연구 결과 오미자 초임계 후 에탄올 추출물의 p21 단백질 발현율은 200 µg/ml에서 99.1%로 확인되어 산화적 세포 손상에 대한 억제 효과가 높을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 경북청정약용작물클러스터사업단의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2004. 3: 1109-1115.
- Chan WKM, Decker EA, Lee JB, Butterfield DA. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. *J Agric Food Chem.* 1994. 42: 1407-1410.
- Cho ES, Lee KW, Lee HJ. Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrogen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK. *Mutat Res.* 2008. 640: 123-130.
- Choi SI, Lee YM, Heo TR. Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2003. 18: 282-288.
- Frankel EN. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chem.* 1996. 57: 51-55.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. In *Antioxidants in nutrition, health, and disease.* 1994. pp.1-62. Oxford University Press. NY, USA.
- Hsu B, Coupar IM, Ng K. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem.* 2006. 98: 317-328.
- Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ. 3, 4-Dihydroxybenzaldehyde purified from the barley seeds (*Hordeum vulgare*) inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via its antioxidant activity. *Phytomedicine* 2009. 16: 85-94.
- Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, Kim BJ, Park JW, Kim HS, Kim DH, Hyun JW. Protective effect of irisolidone, a metabolite of kakkalide, against hydrogen

- peroxide induced cell damage via antioxidant effect. *Bioorg Med Chem*. 2008. 16: 1133-1141.
- Kim CJ, Suh HJ. Antioxidant activities of rhubarb extracts containing phenolic compounds. *Korean J Food Culture* 2005. 20: 77-85.
- Kim JS, Choi SY. Physicochemical properties and antioxidative activities of omija (*Schizandra chinensis* Bailon). *Korean J Food Nutr*. 2008. 21: 35-42.
- Kim MJ, Park EJ. Antioxidative and antigenotoxic effect of omija (*Schizandra chinensis*) extracted with various solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2010. 39: 487-493.
- Kim YG. *Antioxidant*. 2004. Vol. 99, pp. 179-195. Ryo Moon Gak. Seoul, Korea.
- Lee JM, Park HJ. Effects of supplementary diet in iron status and development in infants. *Korean J Nutr*. 2005. 38: 226-231.
- Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*. 1994. 54: 3391-3395.
- Miquel J, Quintanilha AT, Weber H. *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. 1989. pp. 223-244. CRC Press. NY, USA.
- Park C, Kim HJ, Chung KT, Yoon TK, Choi BT, Lee YT, Park DI, Choi YH. Apoptotic cell death by methanol extract of *Phellinus linteus*-Barley corn in human leukemic U937 cells through induction of p21 and bax, and activation of caspase-3. *Korean J Oriental Physiol Pathol*. 2007. 21: 1226-1232.
- Park SY, Chin KB. Evaluation of antioxidant activity in pork patties containing bokbunja (*Rubus coreanus*) extract. *Korean J Food Sci Ani Resour*. 2007. 27: 432-439.
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*. 2002. 12: 162-169.
- Rho SN, Oh HS. Effect of omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts on the growth of liver cancer cell line SNU398. *Korean Nutr*. 2002. 35: 201-206.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem*. 1989. 28: 1057-1060.
- Vuillaume M. Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat Res*. 1987. 186: 43-72.
- Wiseman H. Dietary influences on membrane function: important in protection against oxidative damage and disease. *J Nutr Biochem*. 1996. 7: 2-15.
-