

Effect of *Dendranthema indicum* Extracts on Cell and DNA Damage Induced by Oxidative StressYoung Mi Park¹, Jee In Kim^{1,2}, Chang Ho Lee³, Jae Hwan Lim¹ and Eul Won Seo^{1*}¹Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea²Department of Biochemistry and Cell Biology, Skeletal Diseases Genome Research Center, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea³Gyeongbuk Institute for Bioindustry, Andong 760-380, Korea

Received August 25, 2011 / Revised December 13, 2011 / Accepted December 14, 2011

In this study, we evaluated the protective effects of ethanol extracts from *Dendranthema indicum* on cell and DNA damages induced by oxidative stress. Antioxidant activities of *D. indicum* extracts are higher than scavenging activities of DPPH free radical and hydroxyl radical by 92.8% and 73.8%, respectively, and higher than ferrous iron chelating effects by 59.4%. *D. indicum* extracts showed a protective effect on oxidative cell damage by inhibiting lipid peroxidation by 90.3% in the control group, and inhibiting expression level of p21 protein by 79.6% for the control group. This means *D. indicum* extracts have a great protective effect against oxidative stress. DNA fragmentation inhibition in *D. indicum* extracts were 89.6% for the control group, which makes the movement of DNA tail reduced, and phosphorylation of H2AX was 20.2% of the radical experiment group. This means that *D. indicum* extracts effectively inhibit DNA fragmentation and H2AX phosphorylation. Taken together, we suggest that ethanol extract from *D. indicum* has a role as a useful chemopreventor against oxidative damage.

Key words : Oxidative stress, hydroxyl radical, antioxidant activity, *Dendranthema indicum*

서 론

모든 호기성 생물은 산소를 이용한 물질대사 과정 중 산화 환원과정에 의해 유리 라디칼(free radical)과 수산화 라디칼(hydroxyl radical) 및 과산화수소(hydrogen peroxide) 등과 같은 대사성 물질인 활성산소가 부가적으로 생성된다. 호기성 생체 내에서 이러한 산화촉진물질은 산화억제물질과 적절한 균형을 유지하고 있으나, 여러 요인에 의해 균형상태가 무너지게 되면 산화적 스트레스에 의해 세포 손상이나 병리적 질환이 유발되게 된다[18]. 유리 라디칼 중에서 가장 많은 부분을 차지하는 산소 라디칼(oxygen radical)은 비공유 전자에 의해 불안정한 상태에서 강한 반응성을 갖고 있기 때문에 세포 내 여러 구성성분을 산화시켜 심각한 질병을 초래하기도 하며 [1,3], 유전정보의 손상을 유도하는 DNA 분절을 유발하여 생체 기능을 저하시키는 유전 독성의 원인이 되기도 한다[20].

현대인은 흡연, 각종 환경오염물질, 알코올, 약물, 방사선 등 물리·화학적 요인들에 의해 체내 활성산소가 과다하게 생성되어 심각한 산화적 스트레스에 시달리고 있으며, 이와 관련하여 암, 천식, 심혈관계 질환, 당뇨병, 염증반응 등과 같은 다양한 질병이 보고되고 있다[21]. 이에 따라 산화적 스트레스와 유리 라디칼로 인해 유발되는 생체 손상과 질병을 치료·

예방하기 위한 물질로서 여러 종류의 합성 또는 천연 항산화제가 개발되어 왔다. 하지만 지금까지 보고된 대부분의 항산화제는 최근 일정 수준 이상 섭취 시 질병과 부작용을 유발할 수 있고 높은 가격으로 인해 널리 사용되지 못한다는 문제점이 제기되면서 최근에는 이러한 문제점을 감소시킬 수 있는 천연물 유래 항산화제로 대체하려는 시도가 진행되고 있다[11].

국화와 식물은 현화식물 중 가장 넓게 분포하고 있는 분류군으로, 우수한 약리효과를 가져 전통적으로 식용 및 약용 소재로 유용하게 사용되어 왔다. 국화는 항바이러스, 항균 및 항암 활성 등이 있는 것으로도 보고되어 있으며[16], 감기, 두통, 현기증, 고혈압 등에도 효과적인 것으로 알려져 있다[17]. 최근 Lee 등[13]은 국화추출물이 CCl₄ 처리에 의해 손상된 간 세포에서 산화적 스트레스로 유도된 백혈구 DNA의 손상에 대해 높은 보호 효과가 있다고 보고한 바 있으나, 국화추출물이 산화적 스트레스에 미치는 영향에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국화(*Dendranthema indicum*) 추출물이 산화적 스트레스에 의해 유발되는 세포와 DNA 손상에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

시료 추출

본 연구에 사용된 국화는 안동 소재의 가을신선쪼에서 수확하여 건조한 국화(*Dendranthema indicum*)를 사용하였다. 국화

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5462, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : ewseo@andong.ac.kr

로부터 시료를 추출하기 위해 국화 100 g에 1,000 ml의 70% ethanol을 혼합하여 25°C에서 총 3회 환류 추출 후 여과하여 농축하였다. 이 후 petroleum ether와 ethyl acetate로 총 5회 분획하였으며 상온에서 24시간 동안 sodium sulfate를 처리하여 여과 후 건조하였다. 건조한 추출물은 밀봉 후 -70°C에 보관하여 시료로 사용하였다.

국화추출물의 항산화활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 라디칼 제거능의 측정은 Hsu 등[5]의 방법에 따라 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, USA)로 희석한 농도별 국화추출물 40 μ l와 300 mM DPPH 760 μ l를 혼합하여 37°C에서 반응시킨 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 수산화 라디칼 제거 활성은 1.5 mM FeSO₄ (Sigma-Aldrich, USA) 250 μ l, 6 mM H₂O₂ (Sigma-Aldrich, USA) 175 μ l와 농도별 시료 75 μ l를 혼합하여 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다[19]. Fe²⁺-chelating 활성은 시료에 2 mM FeCl₂ (Sigma-Aldrich, USA) 15 μ l와 5 mM ferrozine (Sigma-Aldrich, USA) 30 μ l를 혼합하여 상온에서 15분 반응시킨 후 562 nm에서 Fe²⁺-ferrozine 용액의 흡광도를 측정하였다[5]. 각 실험 항목에서 농도에 따른 추출물의 항산화활성은 다음의 식으로 %를 계산하였다.

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

세포배양

본 연구에 사용한 NIH 3T3 마우스 섬유아 세포주는 한국세포주은행(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco Inc., USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Inc., USA)을 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

국화추출물의 NIH 3T3 세포 생존에 미치는 영향은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 분석을 통해 실시하였다. NIH 3T3 세포(5×10³ cells/well)를 96-well cell plate에 분주한 후 시료, FeSO₄, H₂O₂를 각각 농도별로 처리하여 24시간 배양 후 MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액(1 mg/ml)을 처리하여 4시간 반응시킨 다음 DMSO로 세포 내 염색액을 용출시킨 후 microplate reader (Infinite[®] 200, Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 측정치는 시료의 세포에 대한 독성을 나타내며 생존율은 시료 처리군을 대조군에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

지질과산화 억제능 분석

국화추출물이 수산화 라디칼에 의한 2차 산화물 생성에 미

치는 영향을 조사하기 위한 지질과산화 억제능은 NIH 3T3 세포(2×10⁵ cells/ml)에 시료와 FeSO₄, H₂O₂를 처리하여 배양한 후 회수하여 1.15% KCl로 균질화시켰으며, 0.2 ml sodium dodecyl sulfate (8.1%), 1.5 ml acetic acid (20%) 및 1.5 ml thio-barbituric acid (0.8%)를 첨가하여 95°C에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 5 ml n-butanol/pyridine mixture (15:1, v/v)로 분획을 통해 얻은 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다[10].

DNA 손상 억제능 분석

국화추출물이 유리 라디칼에 의한 유전정보의 손상을 유발하는 DNA 분절에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 pX-174 RF I plasmid DNA (New England BioLabs, County Road Ipswich, MA) 분석을 실시하였다. pX-174 RF I plasmid DNA 5 μ l, 농도별 시료 10 μ l, FeSO₄와 H₂O₂ 5 μ l를 혼합하여 37°C에서 반응시킨 후 50% glycerol (v/v), 40 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue를 첨가하여 전기영동 후 분석하였다. 또한 DNA tail 이동도 분석은 Cho 등[2]의 방법에 따라 시료를 처리한 NIH 3T3 세포에 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 혼합한 후 전기영동을 실시하여 확인하였다.

Western blot 분석

NIH 3T3 세포(1×10⁶ cells/well)를 6-well plate에서 분주하여 16시간 배양한 후 농도별 시료, FeSO₄, H₂O₂를 처리하여 24시간 반응시켰다. 반응 후 시료를 처리한 NIH 3T3 세포로부터 lysis buffer (50 mM Tris - HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] and 1 mM DTT) 이용하여 추출한 단백질을 15% SDS-PAGE로 전기영동 후 PVDF membrane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 transblot 하였다. 이 후 5% BSA로 blocking 시키고, p21 rabbit polyclonal IgG (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 P-histone H2AX rabbit antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)로 1차 처리 후 IgG HRP-linked anti-rabbit antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)를 2차 처리하여 반응시켰다. 이 후 ECL detection polaroid camera (Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 촬영하였으며, 발현 수준은 Un-SCAN-IT gel Version 5.1 (Silk Scientific, Inc.). 프로그램을 통해 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하였으며 각 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계처리는 SPSS version 12.0로 분석한 후 t-검정을 실시하여 분산과 평균

의 동일성 여부를 검정하였으며, 분석결과는 일원분산분석 (one way ANOVA)에 의한 Duncan 검정을 실시하여 p 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

국화추출물의 항산화활성

본 연구에서 국화추출물의 항산화 활성을 분석하기 위하여 DPPH 유리 라디칼과 수산화 라디칼의 제거 활성 및 Fe^{2+} -chelating 효과를 조사하였다. 국화추출물의 DPPH 유리 라디칼 제거능은 농도가 높아짐에 따라 활성이 증가하여 0.32 $\mu\text{g/ml}$ 에서 7.4%, 1.6 $\mu\text{g/ml}$ 에서 10.5%, 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 23.6%, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 71.3%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 92.8%의 제거 효과를 나타내었다(Fig. 1A). 또한 수산화 라디칼 제거능은 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도

에서 약 50% 미만의 활성을 나타내었으나 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 73.6%의 제거 활성을 보여주었다(Fig. 1B). 최근 연구에 따르면 국화과 식물인 구절초(*Chrysanthemum zawadskii*) 추출물의 DPPH 유리 라디칼 소거능은 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 51%로 나타내고 있으며[24], 수리취(*Synurus palmatopinnatifidus*) 추출물은 73%의 DPPH 유리 라디칼 제거 활성을 보여 우수한 항산화 효과를 가진다고 보고된 바 있다[14]. 본 연구에서도 국화추출물의 DPPH 유리 라디칼 제거능은 농도에 따라 약 92.8%의 활성을 나타내고 있어 높은 유리 라디칼 제거 효과를 보여주고 있다.

국화추출물의 Fe^{2+} -chelating 효과를 분석해 보면 0.32 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.6%, 1.6 $\mu\text{g/ml}$ 에서 5.7%, 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서 17.0%, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 39.4%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 59.4%로 농도가 높아질수록 활성이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1C). Woo 등[23]은

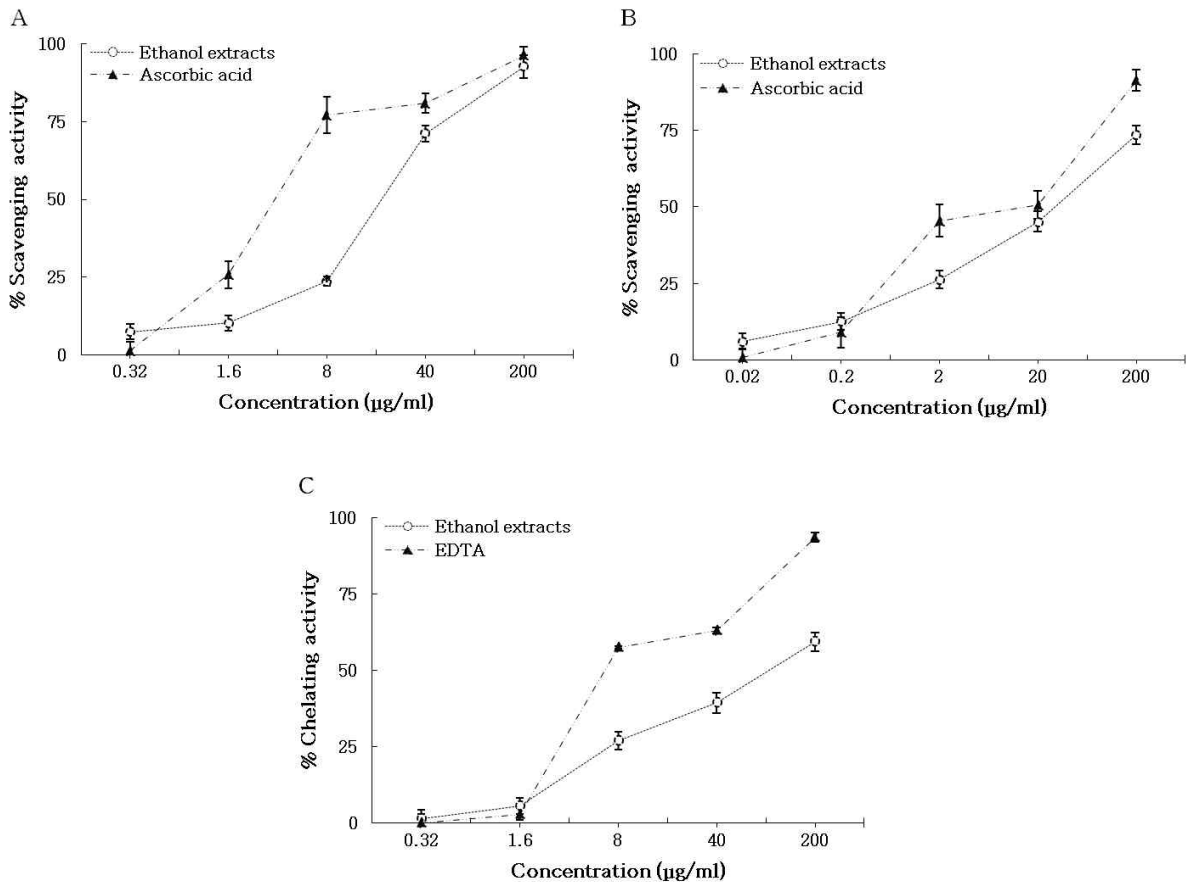


Fig. 1. (A) DPPH free radical and (B) hydroxyl radical scavenging activities and (C) Fe^{2+} -chelating activities of ethanol extracts from *D. indicum*. (A) Reaction mixture containing 40 μl of test samples (4 mg/ml dissolved in DMSO) and 760 μl of DPPH ethanol solution were incubated at 37°C for 30 min and absorbance was measured at 515 nm. (B) The reaction mixture contained 250 μl of $FeSO_4$, 175 μl of H_2O_2 , 300 μl of sodium salicylate and varying concentrations of the extracts. After a reaction for 30 min at 37°C, the absorbance was measured at 562 nm. (C) The reaction mixture contained 15 μl $FeCl_2$, 30 μl ferrozine, 150 μl varying 4 concentrations of the extracts and 605 μl distilled water. The absorbance of the Fe^{2+} -ferrozine complex was measured at 562 nm. The absorbance values were converted to scavenging and chelating effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging and chelating effect (%) values \pm S.D. Ascorbic acid (A, B) and EDTA (C) were used for the positive control.

남구절초(*D. zawaskii*) 지상부의 초음파 추출물이 코스모스(*Cosmos bipinatus*) 추출물보다 우수한 chelating 효과를 보인다고 하였는데, 본 연구에서도 국화추출물은 Fe²⁺-chelating 효과가 약 60%로 나타나 비교적 높은 chelating 효과를 가지는 것으로 조사되었다.

최근 Woo 등[22]은 충남 태안군에서 채집 후 재배한 감국(*D. indicum*)의 부위별 추출물이 갖는 항산화 활성을 조사한 결과, 꽃 추출물이 잎줄기 추출물에 비해 DPPH 유리 라디칼 제거능과 Fe²⁺-chelating 효과가 더 높게 나타난다고 보고한 바 있다. 본 연구에서 국화추출물의 DPPH 유리 라디칼 제거능(RC₅₀=0.31 mg·ml⁻¹)과 Fe²⁺-chelating 효과(RC₅₀=1.27 mg·ml⁻¹)은 상위 연구의 DPPH 유리 라디칼 제거능(RC₅₀=0.47 mg·ml⁻¹)과 Fe²⁺-chelating 효과(RC₅₀=2.02 mg·ml⁻¹)보다 더 높은 활성을 보이는 것으로 조사되었는데, 이는 두 연구의 국화추출물이 서로 다른 지역적 특이성에 따른 생리활성 성분의 차이에 따른 것으로 생각된다.

국화추출물의 산화적 세포 손상에 대한 보호 효과

국화추출물이 세포 생존에 미치는 영향을 조사해 보면 대조군에 비해 Fe²⁺와 H₂O₂만 처리한 라디칼 처리군의 세포 생존율은 70.8%의 활성을 보여주고 있으나 시료를 처리한 실험군에서는 98.7%의 생존율을 나타내주고 있어 세포에 대한 시료의 독성은 거의 없는 것으로 조사되었다(Fig. 2). 이러한 조건

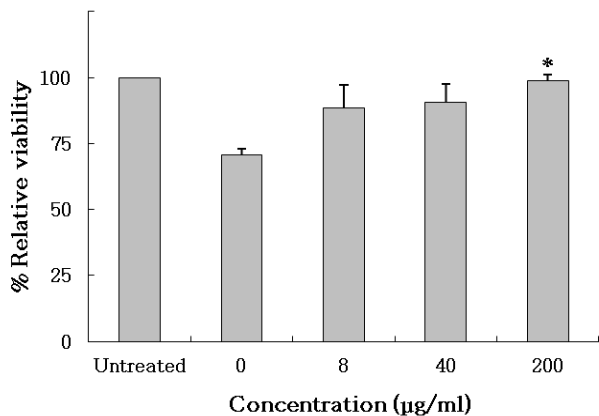


Fig. 2. Effect of the ethanol extracts from *D. indicum* on oxidative stress induced by hydroxyl radical. The viability of NIH 3T3 cells was evaluated by a MTT assay. NIH 3T3 cells (5×10³ cells/well) were cultured in 96-well plate at 37°C for 24 hr. After 24 hr, ethanol extracts from *D. indicum* was treated to each well according to the concentration, FeSO₄, H₂O₂, and then incubated. After, 50 µl of MTT solution (1 mg/ml) was treated to each well for 4 hr, the supernatant was removed, and then 100 µl of DMSO was treated to each well. The observance was measured with a microplate reader at 570 nm. *p<0.05 indicate significant difference between the untreated group and the treated group.

에서 국화추출물을 처리하였을 때 지질과산화 억제능은 8 µg/ml에서 56.6%, 40 µg/ml에서 69.8%, 200 µg/ml에서 90.3%로 농도가 높아짐에 따라 활성이 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3). 최근 연구에서 꿀풀(*Prunella vulgaris*) 꽃대의 지질과산화 억제능은 1,000 µg/ml의 농도에서 84.6%로 나타나 2차 산화물의 생성을 억제하는데 유효하다고 하였으며[15], 백작약(*Paeonia japonica*) 열수 추출물의 지질과산화 억제능은 50 µg/ml 농도에서 62%로 나타나 산화적 스트레스의 감소에 효과적이라고 보고된 바 있다[6]. 본 연구에서도 라디칼에 의한 지질과산화 반응에서 국화추출물을 200 µg/ml 처리하였을 경우 약 90%의 억제 활성을 보였다.

국화추출물이 산화적 스트레스에 의한 p21 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 p21 단백질 발현율을 대조군에 대한 시료 처리군의 상대적 발현으로 분석하였다. 국화추출물을 처리한 경우에 p21 단백질의 발현은 1.6 µg/ml에서 23.9%, 8 µg/ml에서 65.1%, 40 µg/ml에서 70.3%, 200 µg/ml에서 79.6%으로 나타나 농도가 높아질수록 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서 본 연구의 국화추출물은 농도가 높아질수록 p21 단백질의 발현이 증가되는 것으로 보아 세포의 비정상적 증식을 억제하고 손상된 세포의 apoptosis를 유도하는데 효과가 있을 것으로 생각된다.

국화추출물의 산화적 DNA 손상에 대한 보호 효과

국화추출물이 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상에 미치

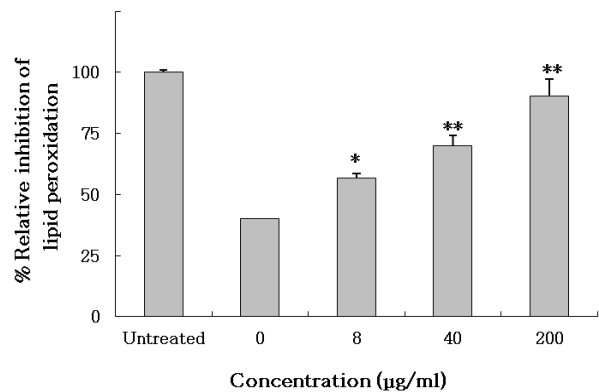


Fig. 3. The lipid peroxidation effect of the ethanol extracts from *D. indicum* on cell damage induced by oxidative stress. The NIH 3T3 cells were cultured in a 6-well plate at 2×10⁶ cells/well for 16 hours. After plating, the cells were treated with the varying concentrations of the extracts from *D. indicum*, H₂O₂ and FeSO₄ were added to the plate and then the cells were incubated. The cell lysate was mixed with 0.1 ml of 8.1% sodium dodecylsulfate, 0.75 ml of 20% acetic acid, and 0.75 ml of 0.8% thiobarbituric acid. After, the supernatant fractions were isolated and the absorbance was measured at 532 nm. *p<0.05, **p<0.01 indicate a significant difference between the untreated group and the treated group.

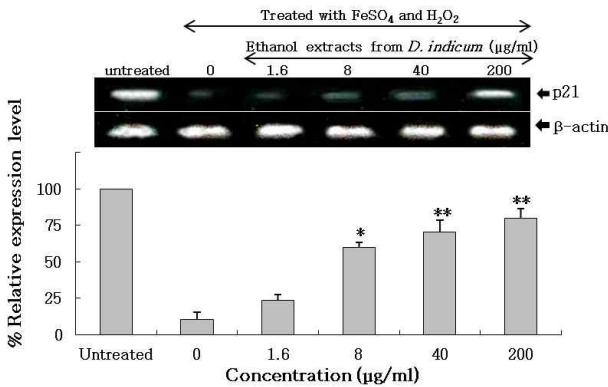


Fig. 4. Expression effect of the ethanol extracts from *D. indicum* on p21 protein induced by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated and lane 2 is treated with FeSO₄ and H₂O₂ without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extract (1.6, 8, 40 and 200 µg/ml). A protein extracted from the cells was separated on 15% SDS-PAGE gel following the manufacturer's instruction. Gels were transblotted on to PVDF membranes for western blot analysis. The membranes were blocked for non-specific binding for 90 min in block and then washed with 1× TBS solution. After, the membrane was incubated with p21 antibody at 1:1,000 dilutions and with gentle shaking. After washing, the membrane was treated with the detection agent and immediately developed. **p*<0.05, ***p*<0.01 indicate a significant difference between the untreated group and the treated group.

는 영향을 조사해보면, 대조군의 ΨX-174 RF I plasmid DNA는 super coiled (SC) 형태로 확인되고 있으나, Fe²⁺와 H₂O₂만 처리한 라디칼 처리군에서는 DNA의 분절로 인하여 SC 형태가 open circular (OC) 형태로 전환되고 있다. 이러한 조건에서 시료를 처리하였을 때 SC 형태의 DNA는 1.6 µg/ml에서 55.8%, 8 µg/ml에서 64.7%, 40 µg/ml에서 71.6%, 200 µg/ml에서 88.7%로 조사되어 시료의 농도가 높아질수록 SC 형태의 DNA로부터 OC 형태의 DNA로 전환되는 것을 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 5). 기존 여러 추출물들이 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상에 미치는 영향을 조사해보면, 밀몽화 (*Buddleja officinalis*) 추출물이 DNA 분절화에 미치는 영향을 조사해 보면 200 µg/ml에서 SC 형태에서 OC 형태로의 전환을 80% 억제하였으며[4], 오미자 (*Schizandra chinensis*) 에탄올 추출물은 시료의 농도가 높아질수록 DNA 손상 억제능도 증가하여 200 µg/ml의 농도에서 약 93%의 억제 활성을 보인다고 한 바 있다[8]. 본 연구의 국화추출물도 활성산소에 의한 DNA의 분절을 효과적으로 억제하고 있다.

DNA tail의 이동도를 살펴보면 대조군에 비해 Fe²⁺와 H₂O₂만을 처리한 라디칼 처리군에서는 tail의 이동이 증가되는 경향을 보여주고 있으나, 시료와 라디칼을 함께 처리한 경우 라디칼 처리군에 비해서 농도가 증가함에 따라 이동이 점차적으

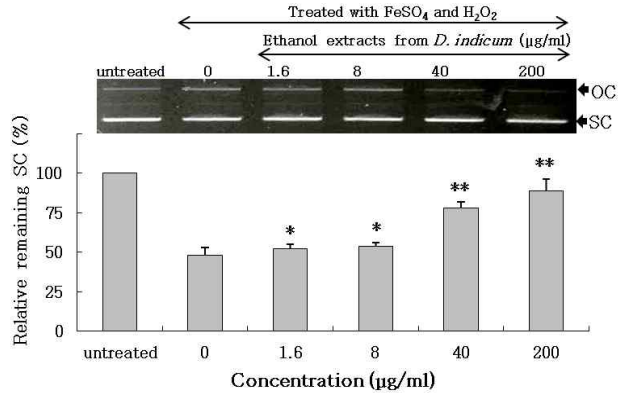


Fig. 5. Inhibition of the ethanol extracts from *D. indicum* against the conversion of SC into OC induced by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated and lane 2 is treated with FeSO₄ and H₂O₂ without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extract (1.6, 8, 40 and 200 µg/ml). Each mixture was incubated at 37°C for 30 min. After 30 min, 5 ml of reaction stop buffer and the reaction mixtures were electrophoresed on 1% agarose gel, and the DNA in the gel was visualized and photographed under ultraviolet light after ethidium bromide staining. **p*<0.05, ***p*<0.01 indicate a significant difference between the untreated group and the treated group.

로 짧아지고 있다(Fig. 6). 최근 Kim과 Park [12]은 오미자 추출물이 DNA tail의 이동을 73%로 억제하여 유전독성으로부터 DNA를 보호하는 데 유효할 것이라고 한 바 있다. 본 연구에서도 국화추출물은 산화적 스트레스에 의한 DNA 분절화를 억제하고 DNA tail의 이동을 감소시키는 것으로 조사되었다.

국화추출물이 수산화 라디칼에 의한 DNA의 인산화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Fe²⁺와 H₂O₂만 처리한 라디칼 처리군에 대해 시료 처리군의 상대적 인산화비로 분석하였다. 시료 처리에 따른 phospho-H2AX 발현 수준은 1.6 µg/ml에서 51.2%, 8 µg/ml에서 24.4%, 40 µg/ml에서 21.5%, 200 µg/ml에서 20.2%로 나타나 시료의 농도가 높아짐에 따라 감소하는 경향을 보여주고 있다(Fig. 7). 즉, 국화추출물의 농도가 높아질수록 phospho-H2AX 발현은 감소하여 라디칼 처리군에 비해 약 79.8%의 억제 효과를 나타내는 것으로 분석되었다. 기존 여러 추출물들이 산화적 스트레스에 의한 phospho-H2AX의 발현에 미치는 영향을 조사한 연구에서 보리 (*Hordeum vulgare*) 씨앗에서 정제된 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 phospho-H2AX 발현 억제율은 200 µg/ml에서 80%를 나타내며[9], 까마중 (*Solanum nigrum*)에서 정제한 lunasin 단백질은 phospho-H2AX의 발현 억제율이 10 µM에서 82%를 보인다는 것[7]으로 보아 국화 추출물도 산화적 스트레스에 의한 DNA 인산화를 억제하는데 효과적일 것으로 생각된다.

따라서 본 연구의 국화추출물은 산화적 스트레스를 유발하는 유리 라디칼과 생체 내 강한 독성을 나타내는 수산화 라디칼을 제거하는 데 매우 효과적인 것으로 나타났다. 또한 O₂^{•-}

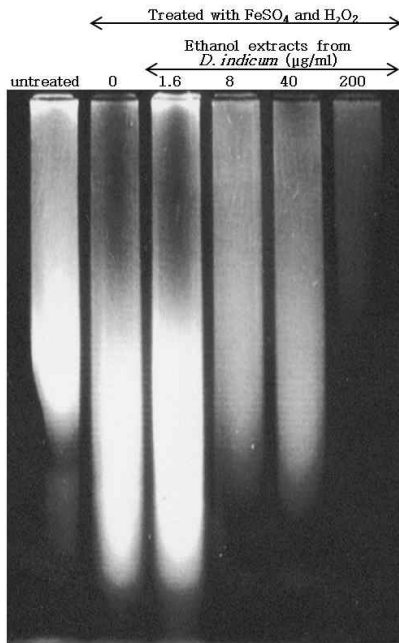


Fig. 6. Inhibitory effect of the ethanol extracts from *D. indicum* against intracellular DNA migration induced by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated, and lane 2 is treated with FeSO₄ and H₂O₂ without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extract (1.6, 8, 40 and 200 µg/ml). Each cell was resuspended with 20 µl of lysis buffer by pipetting cells to ensure complete lysis and then incubated. After, 5 µl of RNase A was added to the supernatant, and each cell was incubated at 55°C for another 60 min. The reaction mixtures were electrophoresed on 2% agarose gel, and the DNA in the gel was visualized and photographed under ultraviolet light after ethidium bromide staining.

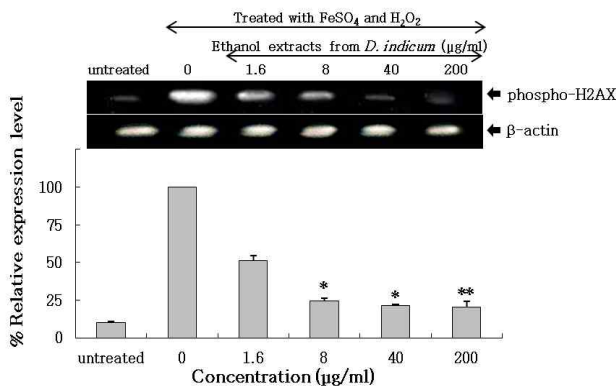


Fig. 7. Expression effect of ethanol extracts from *D. indicum* on H2AX induced by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated and lane 2 is treated with FeSO₄ and H₂O₂ without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extract. Protein extracted from the cells was separated on 15% SDS-PAGE gel following the manufacturer's instruction. Transblotted on to membranes were blocked for non-specific binding for 90 min in block buffer. After, the membrane was incubated with phospho-H2AX antibody at 1:1000 dilutions. After washing, the membrane was treated with the detection agent and immediately developed. **p*<0.05, ***p*<0.01 indicate a significant difference between the treated group (treated with FeSO₄, H₂O₂ without extracts) and untreated or treated group (treated with FeSO₄, H₂O₂, varying extract).

H₂O₂, ROO[•] 등과 같은 2차 산화물의 생성을 억제할 뿐만 아니라 세포의 비정상적인 증식을 조절하는 것으로 알려진 p21 단백질의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 이와 더불어

유리 라디칼에 의한 DNA의 분절화와 DNA의 인산화를 억제시켜 DNA의 open circular form 전환과 phospho-H2AX의 발현을 감소시키는 것으로 조사되었다. 이러한 결과로 미루어 보아 국화 추출물은 산화적 스트레스로 인한 생체 독성으로부터 세포와 DNA를 보호하는 데 효과적일 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2010년 경북 안동 바이오기술 개발 프로그램의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

References

- Balavoine, G. G. and Y. V. Genletii. 1999. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants, Part I: convenient assay. *Nitric Oxide* **3**, 40-54.
- Cho, E. S., K. W. Lee, and H. J. Lee. 2008. Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrogen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK. *Mutat. Res.* **640**, 123-130.
- Grisham, M. B. 1992. Reactive oxygen metabolism, pp. 39, In Grisham, M. B. (ed.), *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine* R. G. Landers Co., Austin.
- Hong, S. C., J. B. Jeong, and J. H. Jeong. 2008. *Buddleja officinalis* prevents the normal cells from oxidative damage via antioxidant activity. *Korean J. Plant Res.* **21**, 449-456.
- Hsu, B., I. M. Coupar, and K. Ng. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem.* **98**, 317-328.
- Jeong, I. Y., J. S. Lee, U. H. Jeong, H. R. Park, and S. K.

- Jo. 2003. Inhibitory effect of hot-water extracts of *Paeonia japonica* on oxidative stress and identification of its active components. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 739-744.
7. Jeong, J. B., B. O. de Lumen, and H. J. Jeong. 2010. Lunasin peptide purified from *Solanum nigrum* L. protects DNA from oxidative damage by suppressing the generation of hydroxyl radical via blocking fenton reaction. *Cancer Lett.* **293**, 58-64.
8. Jeong, J. B. and H. J. Jeong. 2009. *Schisandra chinensis* inhibits oxidative DNA damage and lipid peroxidation via anti-oxidant activity. *Korean J. Plant Res.* **22**, 195-202.
9. Jeong, J. B., S. C. Hong, and H. J. Jeong. 2009. 3, 4-dihydroxybenzaldehyde purified from the barley seeds (*Hordeum vulgare*) inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via its antioxidant activity. *Phytotherapy* **16**, 85-94.
10. Kang, K. A., R. Zhang, M. J. Piao, D. O. Ko, Z. H. Wang, B. J. Kim, J. W. Park, H. S. Kim, D. H. Kim, and J. W. Hyun. 2008. Protective effect of irisolidone, a metabolite of kakkalide, against hydrogen peroxide induced cell damage via antioxidant effect. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 1133-1141.
11. Kim, J. W., B. S. Moon, Y. M. Park, N. H. Yoo, I. J. Ryoo, T. C. Nguyen, I. D. Yoo, and J. P. Kim. 2005. Structures and antioxidant activity of diketopiperazines isolated from the mushroom *Sarcodon aspratus*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 93-97.
12. Kim, M. J. and E. J. Park. 2010. Antioxidative and anti-genotoxic effect of omija (*Schisandra chinensis*) extracted with various solvents. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 487-493.
13. Lee, H. J., Y. I. Hwang, E. J. Park, and S. U. Choi. 2011. Antihepatotoxic and antigenotoxic effects of herb tea composed of *Chrysanthemum morifolium* ramat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 78-83.
14. Lee, K. J., I. J. Yun, H. Y. Kim, J. H. Kim, Y. J. Kim, D. W. Kim, and S. H. Lim. 2010. Antioxidative activity of solvent extracts from *Synurus excelsus* and *Synurus palmatopinnatifidus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1893-1897.
15. Lee, S. J., N. J. Sung, H. G. Jeong, J. H. Shin, Y. C. Chung, and J. K. Seo. 2008. Antioxidant activities of methanol extracts from *Prunella vulgaris*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1535-1541.
16. Nam, S. H. and M. S. Yang. 1995. Antibacterial activities of extracts from *Chrysanthemum boreale* M. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 269-272.
17. Park, N. Y., J. H. Kwon, and H. K. Kim. 1998. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Chrysanthemum morifolium* by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1189-1196.
18. Punched, N. A. and F. J. Kelly. 1996. A practical approach, pp. 1-8, In Punched, N. A. and F. J. Kelly (eds.), *Free radicals*. Oxford University Press, New York.
19. Smirnoff, N. and Q. J. Cumbes. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057-1060.
20. Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44-84.
21. Wickens, A. P. 2001. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology* **128**, 379-391.
22. Woo, J. H., S. L. Shin, and C. H. Lee. 2010. Antioxidant effect of 80% ethanol extracts obtained from three *Dendranthema* species. *Korean J. Plant Res.* **23**, 47-53.
23. Woo, J. H., S. L. Shin, Y. D. Chang, and C. H. Lee. 2010. Antioxidant effect according to extraction method in extracts of *Dendranthema zawadskii* var. *yezoense* and *Cosmos bipinnatus*. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* **28**, 462-468.
24. Woo, K. S., J. S. Yu, I. G. Hwang, Y. R. Lee, C. H. Lee, H. S. Yoon, J. S. Lee, and H. S. Jeong. 2008. Antioxidative activity of volatile compounds in flower of *Chrysanthemum indicum*, *C. morifolium*, and *C. zawadskii*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 805-809.

초록 : 국화추출물이 산화적 스트레스에 의해 유발되는 세포와 DNA 손상에 미치는 영향

박영미¹ · 김지인^{1,2} · 이창호³ · 임재환¹ · 서울원^{1*}

(¹안동대학교 자연과학대학 생명과학과, ²경북대학교 의과대학 골격계 질환 유전체 연구센터, ³경북바이오 산업연구원)

본 연구는 국화추출물이 산화적 스트레스에 의한 세포와 DNA의 손상에 미치는 영향을 조사하였다. 국화추출물의 DPPH 유리 라디칼과 수산화 라디칼의 제거 활성은 200 µg/ml에서 각각 92.8%, 73.8%로 나타났으며, Fe²⁺-chelating 효과는 59.4%로 나타났다. 국화 추출물의 지질과산화 억제능은 대조군의 90.3%의 활성을 보였으며, p21 단백질의 발현 수준은 대조군의 79.6%로 나타나 라디칼 처리군에 비해 높은 것으로 조사되었다. 또한 국화추출물의 DNA 분절화 억제 활성은 대조군의 89.6%를 보였고, DNA tail의 이동은 농도에 따른 차이는 있으나 대조군과 비교적 유사한 수준으로 감소되는 경향을 나타내었으며 phospho-H2AX 단백질의 발현은 라디칼 처리군의 79.8%에 해당하는 수준을 보여 DNA 인산화를 억제하는 데 높은 활성을 나타내었다. 따라서 본 연구의 국화추출물은 산화적 스트레스에 의한 생체 내 독성으로부터 세포와 DNA를 보호하는 데 효과적으로 작용하는 천연 항산화 물질로서의 응용이 기대된다.