

가지(*Solanum melongena* L.) 활성물질의 라디칼 소거능과 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과

김현영¹ · 조윤주² · Yamabe Noriko³ · 조은주^{2*}

¹경남과학기술대학교 식품과학부, ²부산대학교 식품영양학과 및 노인생활환경연구소, ³토야마 대학교 화한약 연구소

Free radical scavenging activity and protective effect from cellular oxidative stress of active compound from eggplant (*Solanum melongena* L.)

Hyun Young Kim¹, Yun Ju Cho², Noriko Yamabe³, Eun Ju Cho^{2*}

¹Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

²Department of Food Science and Nutrition & Research Institute of Ecology for the Elderly, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

³Institute of Natural Medicine, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

Received on 3 November 2011, revised on 14 November 2011, accepted on 18 December 2011

Abstract : To investigate the protective effect of eggplant (*Solanum melongena* L.) and its active compound, delphinidin, we used *in vitro* and cellular system. The active fraction from eggplant, BuOH fraction, showed protective effect from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in WI-38 fibroblast cells. It suggests that eggplant would have the protective activity from radical-induced oxidative damage and its BuOH fraction would play the crucial role with antioxidative activity. In addition, delphinidin, the active compound from eggplant, exerted the strong 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging effect with IC₅₀ value of 6.59 µg/mL. Furthermore, the cellular oxidative stress was induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) in LLC-PK₁ cells, while treatment of delphinidin attenuated AAPH-induced oxidative stress as dose-dependent manner. The present study suggests the antioxidative activity of eggplant and delphinidin against free radical-induced oxidative stress.

Key words : Free radical, Delphinidin, Eggplant, Oxidative stress, Antioxidative activity

I. 서론

Superoxide anion(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), singlet oxygen(¹O₂), hydroxyl radical(·OH), peroxy radical(ROO·) 등의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 nitric oxide(NO·), nitrogen dioxide(NO₂·), peroxynitrite(ONOO⁻), alkyl peroxynitrites(LOONO) 등의 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 광범위한 생체 분자의 산화적 손상 및 mitochondria 손상을 야기시킨다(Darley-Usmar 등, 1995; Fridovich, 1978; Halliwell 등, 1999; Kodama, 1988; Patel 등, 1999). ROS와 RNS에 의한 산화적 스트레스는 생체 내 항산화 방어 시스템과 유리기 생성계의 불균

형을 유발하여 세포의 항상성 상실을 가져오므로써 노화를 비롯하여 암, 동맥경화증, 당뇨병 등 많은 질환들을 초래하는 것으로 여겨진다(Chung 등, 2000; Cutler, 1984; Sarkar과 Fisher, 2006; Willcox 등, 2004). ROS와 RNS에 의한 손상을 개선시키기 위한 항산화 방어 시스템에는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 같은 생체 내의 활성산소 제거 효소에 의해 조절되는 항산화시스템과 주로 음식을 통해 섭취하는 β-carotene, 비타민 C, 비타민 E 등의 비효소적인 항산화 시스템이 존재한다(Andersen 등, 1997; Nuttall 등, 1999; Peng 등, 2000). 최근 들어 산화적 스트레스가 다양한 질환의 원인이 되고 있음이 밝혀져 이를 개선시킬 수 있는 항산화제에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있는데 특히 식품을 통해 섭취하는 천연 항산화제가 유해성은 적으면서

*Corresponding author: Tel: +82-51-510-2837

E-mail address: ejcho@pusan.ac.kr

효과적인 것으로 여겨지고 있다(Kuhn, 2003; Warnholtz 과 Munzel, 2000).

가지(*Solanum melongena* L.)는 가지과에 속하는 일년생으로 안토시아닌이 풍부한 채소의 하나이며, 미국 시사주간지인 타임지가 선정한 10대 건강식품으로 채택된 식품이기도 하다. 가지는 한방에서 가자라고 하여 민간요법으로 많이 사용하였는데, 혈중 콜레스테롤치 상승을 억제시키고, 항암효과, 간장 및 췌장 기능 향진, 이뇨작용과 구내염 등에 효능이 있다고 밝혀져 있다. 가지는 이처럼 민간요법에서 광범위하게 효능이 입증되어져 있지만, 이를 뒷받침할 수 있는 과학적인 연구는 미흡한 실정으로, 주로 항암 효과에 대한 연구가 주를 이루고 있다. 또한 가지의 대표적인 anthocyanin 색소성분으로써 nasunin에 대한 생리활성 연구보고(Noda 등, 2000)가 대부분으로 가지와 그 활성성분인 delphinidin의 산화적 스트레스 개선 효과를 비교한 연구는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 가지의 활성분획물과 활성성분인 delphinidin chloride를 이용하여 *in vitro*에서 라디칼 소거능과 cellular system에서의 산화적 스트레스에 대한 개선효과를 검토해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 세포와 시약 및 기기

LLC-PK₁ cell(porcine renal epithelial cell)은 ATCC (Solon, Ohio, USA)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle medium/nutrition mixture F-12(DMEM/F-12), Basal medium eagle(BME)와 fetal bovine serum(FBS)는 Invitrogen CO.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. WI-38 cell (human normal fibroblast cell, population doubling level(PDL, 23))은 ATCC(Solon, Ohio, USA)에서 분양 받았으며, 세포 배양은 5% CO₂ incubator(Forma, model MCO 96, Japan)를 사용하였다.

2. 시료준비

본 실험에 사용한 가지는 경상남도 진주에서 8월경 수확한 것으로 이마트에서 구입하여 사용하였다. 가지를 동결 건조 시킨 후 시료 중량의 20배의 methanol(MeOH)로 12

시간 동안 추출하는 과정을 총 3번 반복한 후 evaporator를 이용하여 농축시켰다. 또한, MeOH 추출물을 시료 중량의 2배의 증류수에 녹인 후 dichloromethane(CH₂Cl₂), *n*-butanol(BuOH)로 3회씩 반복 추출하여 CH₂Cl₂, BuOH, aqueous(H₂O) 획분을 조제하였다. 이 획분들은 감압 농축 후 동결 건조하여 -80℃의 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다. 동결건조한 가지 40 g으로부터 MeOH 추출물을 20 g을 얻었으며, MeOH 추출물을 순차적으로 용매 분획하여 BuOH 분획물을 1.5 g, CH₂Cl₂ 분획물 1.2 g, H₂O 분획물 17.30 g을 얻었다. 가지의 과피색의 대부분을 차지하는 delphinidin의 구조식은 Fig. 1와 같다.

3. DPPH 소거 효과

Ethanol(EtOH)에 녹인 각 농도별 시료 100 μL와 60 μM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 용액 100 μL를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 free radical 소거효과를 IC₅₀(DPPH radical 생성을 50%로 억제하는데 필요로 하는 샘플 농도)로 나타내었다(Hatano 등, 1989).

4. 세포 배양

LLC-PK₁ cell은 DMEM/F-12가 함유된 5% FBS를 이용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. WI-38 cell은 100 units/mL의 penicilin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 BME를 이용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 refeeding 하고 4~5일 만에 phosphate buffered saline으로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

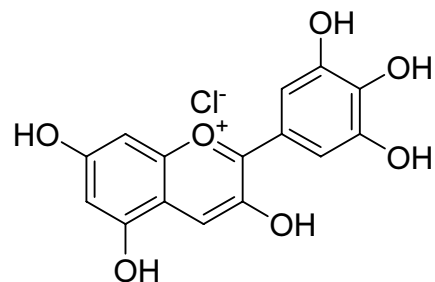


Fig. 1. Structure of delphinidin chloride.

5. Cell viability 측정

LLC-PK1 세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에 10^4 cells/mL로 seeding하여 2시간 배양하였다. 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)를 24시간 처리하여 산화적 스트레스를 가한 후, 시료를 농도별로 24시간 처리하였다. 또한 WI-38 cell은 세포가 confluence 상태가 되면 PDL 26의 young한 WI-38 cell을 96-well plate에 1×10^4 cells/mL 로 seeding 하여, 2시간 배양한 후 시료를 농도별로 24시간 처리하였다. 그 후 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 1시간 처리하여 oxidative stress를 유도하였다. 1 mg/mL의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide solution을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Mosmann, 1983).

6. 통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 각 실험 결과로부터 ANOVA(analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test를 이용하여 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 가지 활성물질의 DPPH radical 소거효과

가지는 쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서 가지의 flavonoid 성분이 triglyceride와 cholesterol level을 감소시켜 hypo-lipidemic 효과를 나타내고, 항산화 효과, 항염증 효과와 항돌연변이 효과를 가지는 것으로 보고되었다(Morita 등, 1978; Noda 등, 2000; Sunheesh 등, 1997). 또한 벤조피렌, 아플라톡신 또는 탄 음식에서 나오는 발암물질 등에 대

Table 1. DPPH radical scavenging activity of delphinidin chloride.

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)
Delphinidin chloride	6.59 ± 0.46
Ascorbic acid	1.10 ± 0.03

Values are mean \pm SD.

IC₅₀ is concentration in μg/mL required DPPH radical formation by 50%.

해 브로콜리와 시금치보다도 약 2배 정도의 돌연변이 유발 억제효과를 나타내었고, 암세포를 이용한 실험에도 항암활성이 높게 나타났다(Morita 등, 1978; Nagase 등, 1998).

가지의 과피색은 안토시아닌계 색소로 delphinidin chloride ($C_{15}H_{11}O_7Cl$)와 이배당체인 hyacin($C_{29}H_{31}O_{18}Cl$) 및 nasunin ($C_{29}H_{31}O_{19}Cl$)이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 특히 delphinidin은 꽃이나 과실에 많이 함유되어 있는 색소 성분으로 식물에서는 자홍색에서 보라색에 이르는 색깔을 띠게 한다(Noda 등, 2000). 그러나 nasunin의 항산화 활성에 대한 연구보고는 많으나, delphinidin에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다. Anthocyanin 기본 구조에서 phenyl기에 수산기(-OH)가 3개 있는 것을 delphinidin이라고 하며, 수산기가 증가하면 청색이 짙어지게 된다. Delphinidin chloride의 DPPH 소거효과를 IC₅₀로 살펴본 결과, 6.59 μg/mL로 ascorbic acid와 비교해 볼 때 우수한 라디칼 소거능을 가진 것으로 확인되었다(Table 1).

2. 가지의 활성 분획물과 활성물질의 세포 모델에서의 산화적 스트레스 개선 효과

Table 2는 가지의 활성분획물인 BuOH 분획물의 WI-38 cell에서의 H_2O_2 에 대한 산화적 스트레스 보호효과를 측정 한 결과이다. WI-38 cell에서 H_2O_2 만 투여한 군의 경우 세포 생존율이 약 57.8%로 대조군에 비해 42.2% 정도 감소되었으나, BuOH 분획물을 농도별로 처리함으로써 H_2O_2 만을 처리한 군에 비해 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 증가하였으며, 10 μg/mL에서 66.0%, 50 μg/mL에서 74.8%, 250 μg/mL에서 82.6%, 500 μg/mL에서 93.4%로 나타나, 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과가 있음을 알

Table 2. Protective effect of BuOH fraction from H_2O_2 -induced oxidative stress in WI-38 fibroblast cell.

BuOH fraction (μg/mL)	Cell viability (%)
10	66.0 ± 2.7 ^c
50	74.8 ± 2.0 ^d
100	76.7 ± 3.1 ^c
250	82.6 ± 3.1 ^b
500	93.4 ± 2.2 ^a
H_2O_2 -treated control	57.8 ± 1.0
Normal	100 ± 1.0

Values are mean \pm SD.

^{a-e}Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 3. Protective effect of delphinidin chloride from AAPH-induced oxidative stress in LLC-PK₁ cell.

Delphinidin chloride (µg/mL)	Cell viability (%)
2.5	61.8 ± 1.8 ^c
5	68.6 ± 3.2 ^c
10	72.4 ± 2.1 ^d
25	74.8 ± 1.8 ^c
50	76.2 ± 1.7 ^b
100	79.5 ± 1.9 ^a
AAPH-treated control	14.7 ± 0.7
Normal	100 ± 1.0

Values are mean ± SD.

^{a-c}Means with different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

수 있었다.

가지에는 알칼로이드, 페놀화합물, 클로로필, 식이섬유 소등이 함유되어 있는데 특히 glycoalkaloid의 대사물질인 solamarginer과 solasonine이 인체 대장암세포와 간암세포의 성장 억제 효과를 보였다(Lee 등, 2004). 또한 가지껍질에 있는 anthocyanin 색소성분인 nasunin 등은 인체에 유해한 활성산소를 막아줄 뿐 아니라, 면역기능, 노화방지, 스트레스 완화 등에 도움을 주고 신체가 정상적인 기능을 회복하고 유지하는데 필수적인 항산화 활성이 높은 것으로 보고되고 있다(Noda 등, 2000). Delphinidin의 산화적 스트레스 개선효과를 살펴보기 위해 AAPH를 처리한 LLC-PK₁의 세포 모델을 이용하였다. AAPH는 free radical initiator로 널리 사용되며, 세포와 조직에서 지질 과산화를 유발하여 세포손상을 야기하는 물질로 알려져 있다(Noguchi, 1998). 세포생존율을 측정된 결과, AAPH만을 처리한 군의 경우 14.7%로 대조군에 비해 85.3% 감소되었으나, delphinidin chloride를 농도별로 처리한 결과 AAPH만을 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 세포 생존율이 유의성 있게 증가되었으며, 2.5 µg/mL에서 61.8%, 10 µg/mL에서 72.3%, 100 µg/mL에서 79.5%로 나타나 AAPH에 의한 LLC-PK₁ cell의 산화적 스트레스 개선효과가 아주 뛰어난 것을 확인하였다(Table 3).

IV. 결론

본 연구에서는 가지의 활성 분획물인 BuOH 분획물과 delphinidin의 free radical 소거능과 산화적 스트레스에 대한 세포 보호효과를 살펴보았다. 가지의 BuOH 분획물은

WI-38 cell에서의 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스에 대해 우수한 세포 보호효과를 보였다. 가지의 과피의 주된 색소인 delphinidin는 DPPH 소거능을 측정된 결과, IC₅₀가 6.59 µg/mL로 아주 강한 DPPH 소거능을 보였다. 또한 AAPH에 의한 LLC-PK₁ cell의 산화적 스트레스에 대해 세포생존율을 증가시킴으로써 delphinidin의 세포 보호효과가 아주 뛰어난 것을 확인할 수 있었으므로, 우수한 항산화제로서의 활성을 나타낼 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. 1997. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. Clin. Chem. 43: 562-568.

Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW, Yu BP. 2000. The inflammatory process in aging. Rev. Clin. Gerontol. 10: 207-222.

Cutler RG. 1984. Antioxidant aging and longevity. Free Radic. Biol. 6: 371-424.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. FEBS Lett. 369: 131-135.

Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science 201: 875-880.

Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. 1999. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good. Free Radic. Res. 31: 651-669.

Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances, VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem. Pharm. Bull. 37: 2016-2021.

Kodama M. 1988. Role of oxygen species in carcinogenesis. Tanpakushitsu Kakusan Koso 33: 3136-3143.

Kuhn M. 2003. Oxygen free radicals and antioxidants. Am. J. Nutr. 103: 58-62.

Lee KR, Kozukue N, Han JS, Park JH, Chang EY, Baek EJ, Chang JS, Friedman M. 2004. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. J. Agric. Food Chem. 52: 2832-2839.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity

- assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Morita K, Hara M, Kada T. 1978. Studies on natural desmutagens : Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation on mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1235-1238.
- Nagase H, Sasaki K, Kito H, Haga A, Sato T. 1998. Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness *in vitro*. *Planta Med.* 64: 216-219.
- Noda Y, Kneyuki T, Igarashi K, Mori A, Packer L. 2000. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicol.* 148: 119-123.
- Noguchi N, Yamashita H, Gotoh N, Yamamoto Y, Numano R, Niki E. 1998. 2,2'-Azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvalero nitrile), a new lipid-soluble azo initiator : Application to oxidations of lipids and low density lipoprotein in solution and in aqueous dispersions. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 259-268.
- Nuttall SL, Kendall MJ, Martin U. 1999. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. *QJM.* 92: 239-244.
- Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM. 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411: 385-400.
- Peng J, Jones GL, Watson K. 2000. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1598-1606.
- Sarkar D, Fisher PB. 2006. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett.* 236: 13-23.
- Sunheesh S, Presannakumar G, Vijayakumar S, Vijayalakshmi NR. 1997. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*. *Plant Foods Hum. Nutr.* 51: 321-330.
- Warnholtz A, Munzel T. 2000. Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* 1: 38-40.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. 2004. Antioxidant and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 275-295.