

Hesperidin과 hesperetin의 cellular system에서의 항산화 효과

조은주¹ · 이 여¹ · Yamabe Noriko² · 김현영^{3*}

¹부산대학교 식품영양학과 및 노인생활환경연구소, ²토야마대학교 화한약연구소, ³경남과학기술대학교 식품과학부

Antioxidative effects of hesperidin and hesperetin under cellular system

Eun Ju Cho¹, Li Li¹, Noriko Yamabe², Hyun Young Kim^{3*}

¹Department of Food Science and Nutrition & Research Institute of Ecology for the Elderly, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Institute of Natural Medicine, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

³Department of Food Science, Gyeongnam National University of science and technology, Jinju 660-758, Korea

Received on 3 November 2011, revised on 15 November 2011, accepted on 18 December 2011

Abstract : In this study, we investigated the antioxidant activity of hesperidin and hesperetin, which are the active compounds from *Citrus junos*, in the cellular system. Under cellular model of oxidative damage using LLC-PK₁ renal epithelial cell, the oxidative damage induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) led to the loss of cell viability, while treatment of hesperidin and hesperetin increased significantly the cell viability as dose-dependent manner. In addition, NO-induced cellular oxidative damage by sodium nitroprusside were significantly recovered by the treatment of hesperidin and hesperetin, showing the increase of cell viability. But hesperidin and hesperetin showed no significant protective effect on O₂⁻-induced cellular oxidative damage. The present study indicates that hesperidin and hesperetin protect against free radical, especially AAPH-induced peroxy radical. In particular, hesperetin has stronger protective effect against oxidative stress than hesperidin.

Key words : Hesperidin, Hesperetin, Oxidative stress, LLC-PK₁ renal epithelial cell

I. 서론

Peroxy radical(ROO·), hydroxyl radical(·OH), superoxide anion(O₂⁻) 등과 같은 반응성이 큰 reactive oxygen species(ROS)와 nitric oxide(NO), peroxynitrite(ONOO⁻)와 같은 reactive nitrogen species(RNS)는 생체 내에서의 만성 퇴행성 질환 및 노화의 원인물질로 알려져 있다(Oberley 등, 1995; Stratton 등, 1997). ROS와 RNS는 환경적 요인이나 생활습관 또는 스트레스로 인해 유발되어지며 축적이 계속되면 지질산화 유도, 단백질의 산화 및 DNA 변성 등을 유발시켜 세포의 정상적인 기능을 억제시키고, 여러 가지 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(Schneider 등, 1990; Rice-Evans 등, 1993; Wright 등, 2002). 특히 ROO·은 체내에서 과잉 생산되면 세포막과 핵산의 주성분인 당질, 지질, 단백질 및 DNA와 같은 분자들

을 과산화시키며, apoptosis와 같은 세포 손상을 초래하게 된다. 또한 이에 의한 산화적 스트레스는 간 섬유화, 신장염, 피부질환, 당뇨병 등의 여러 가지 질환의 원인이 될 수 있으며, 특히, 노화, 염증, 발암, 동맥경화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Altman 등, 1994; Bauer, 2000; Brune 등, 2003).

이와 함께 ROS와 RNS로부터 보호해 주는 역할을 하는 항산화제의 개발이 활발히 이루어지고 있는데 합성 항산화제는 항산화 효과와 경제성이 뛰어나기 때문에 식품에 널리 사용되어 왔으나 자체의 독성 뿐 아니라 고농도 섭취에 따른 유해성 등 여러 문제점으로 인하여, 최근에는 천연 항산화제에 대한 관심이 점차 증대되고 있다(Kim 등, 2004; Huong 등, 2004; Yu 등, 2005). 이에 따라 최근 항산화 효과가 높으면서 안전하고 경제적인 측면에서 우수한 천연 항산화제를 개발하고자 많은 연구가 진행되고 있으며 특히 식품에서 유래되어지는 phenol류, flavonoid류, tocopherol류, ascorbic acid, carotenoid 등의 천연 항산

*Corresponding author: Tel: +82-55-751-3277

E-mail address: hykim@gntech.ac.kr

화제에 대한 관심이 높아지고 있다.

Hesperidin과 hesperetin은 유자의 주요 활성성분이며 담황색 또는 노란색을 띠는 색소화합물로서 식물 중에는 대부분 당과 결합된 hesperidin 형태로 존재한다(Kim 등, 2004; Woo 등, 2006; Ahn 등, 2007). Hesperidin과 hesperetin은 혈관 시스템 보호 효과, 항암 효과, 항염증 효과, 항균 효과, 항 알레르기 작용 등의 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(Monforte 등, 1995; So 등, 1996; Kawaguchi 등, 1997; Sohn 등, 1998; Cha 등, 1999; Middleton 등, 2000; Garg 등, 2001; Kobayashi 등, 2006; Choi, 2007). 그러나 기존연구는 대부분 *in vitro*에서 free radical 소거능을 중심으로 살펴보는 항산화 연구만 있을 뿐, hesperidin과 그의 aglycone형태인 hesperetin의 산화적 스트레스 개선 효과를 비교한 연구는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산화적 스트레스에 대한 hesperidin과 hesperetin의 개선 효과를 LLC-PK₁ renal epithelial cell을 이용하여 cellular system에서 비교 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포와 시료 및 시약

Hesperidin과 hesperetin은 Sigma-Aldrich Co.(USA)로부터 제공 받았으며 hesperidin의 순도는 80%이고 hesperetin의 순도는 95%이상이었다. LLC-PK₁(porcine renal epithelial cell)은 ATCC(Solon, Ohio, USA)에서, 배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS)은 Invitrogen Co.(Grand Island, NY)에서 구입하여 사용하였다. 산화적 스트레스를 유도시키기 위해 사용한 Sodium nitroprusside(SNP)는 Wako(Tokyo, Japan)사 제품을, pyrogallol, 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride(AAPH), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma-Aldrich Co.(USA) 제품을 사용하였다.

2. 세포 배양

LLC-PK₁ cell은 100 units/mL의 penicillin-strep-

tomycin과 5%의 FBS가 함유된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 배양 6~7일 경 phosphate buffered saline(PBS)으로 1차 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심 분리해서 집적된 세포를 배지에 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양 시 각각의 passage number를 기록하여 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 배양하여 실험하였다.

3. Cell viability 측정

세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에 well 당 1×10^4 cells/mL로 seeding 하여 2시간 배양한 후 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 peroxy radical(ROO[·]), NO, O₂⁻의 generator인 AAPH(10 mM), SNP(0.6 mM) 및 pyrogallol(0.5 mM)을 첨가하여 24시간 배양하였다. 산화적 스트레스 유발 후, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 뒤 1 mg/mL의 MTT solution을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 동안 재배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Mosmann, 1983).

4. 통계분석

실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군의 실험 결과는 one way ANOVA로 검증한 후 Duncan's multiple range test로 유의수준 0.05에서 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

Hesperidin과 hesperetin은 유자의 주요 활성성분으로 Hesperidin의 분자구조는 C₁₈H₃₄O₁₅로, 분자량은 610.57 daltons정도이며 hesperetin의 분자구조는 C₁₆H₁₄O₆로, 분자량은 302.27 daltons이다(Calomme 등, 1996; Garg 등, 2001)(Fig. 1).

LLC-PK₁을 포함한 renal proximal tubule cell은 free radicals에 매우 민감한 세포로 잘 알려져 있다. LLC-PK₁

신장 상피 세포는 네프론에서 유도된 MDCK cell보다 산화적 스트레스에 더 민감하며, 산화제에 의한 sodium-dependent glucose와 phosphate transport의 간섭으로 인해 ion gradient를 붕괴시키고 이로 인해 ATP 결핍과 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 불활성화를 유도하며 세포 손상을 초래하게 된다(Andreoli 등, 1993). 따라서 LLC-PK₁ cell에 free radical을 처리하여 산화적 손상을 일으킨 후 이에 대한 개선 효과를 살펴봄으로써 세포 손상에 보호 효과를 나타내는 물질을 확인하는 유용한 모델로 사용되고 있다.

Free radical initiator로 사용된 AAPH는 hydrophilic azo compounds중 하나로서 다른 효소의 작용이나 생리적인 변화 없이 단분자적으로 변성된다. 이렇게 변성된 AAPH는 두 carbon radical과 질소로 분해되는데 이 carbon

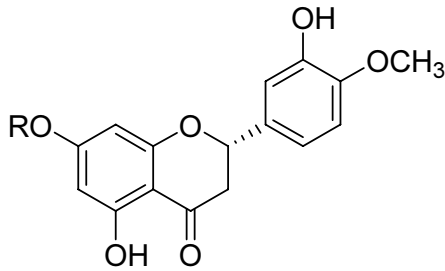


Fig. 1. Chemical structure of hesperidin (R: -Glc-Rhm) and hesperetin (R: -H).

radical은 다른 carbon radical과 다시 결합하여 안정적인 구조를 취하기도 하지만 대부분은 산소와 반응하여 peroxy radical을 생성하게 되며, 이 peroxy radical은 세포의 손상을 유발하고, 생체 내 단백질, 지질 등에 산화적 스트레스를 주는 요인으로 작용하게 된다(Terao 등, 1986; Niki, 1990). 또한 순환계에서 AAPH로 생성된 free radical은 순환계혈액과의 접촉을 통해 혈액 속 고분자 물질이나 장기의 세포에 손상을 줄 수 있다.

따라서 LLC-PK₁ cell에 radical generator인 AAPH 처리 후 세포 생존율을 측정하여 LLC-PK₁ cell에 대한 hesperidin과 hesperetin의 산화적 스트레스에 대한 개선 효과를 살펴본 결과 AAPH만을 처리한 control군은 세포 생존율이 33.4%로 감소하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 확인할 수 있었다. 반면, hesperidin과 hesperetin을 각각 농도별로 처리했을 경우 세포 생존율이 농도 의존적으로 상승하였다. 특히 hesperetin이 100 $\mu\text{mol/l}$ 에서 97.27%의 생존율을 나타내었다. 따라서 hesperidin과 hesperetin은 AAPH에 의한 LLC-PK₁ cell의 산화적 스트레스에 대한 우수한 개선 효과를 가진 것으로 나타났다 (Fig. 2).

NO 생성 화합물인 SNP는 neuroprotective agent로 작용하며 또한 atherogenesis의 주원인인 smooth muscle cell의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Nunokawa

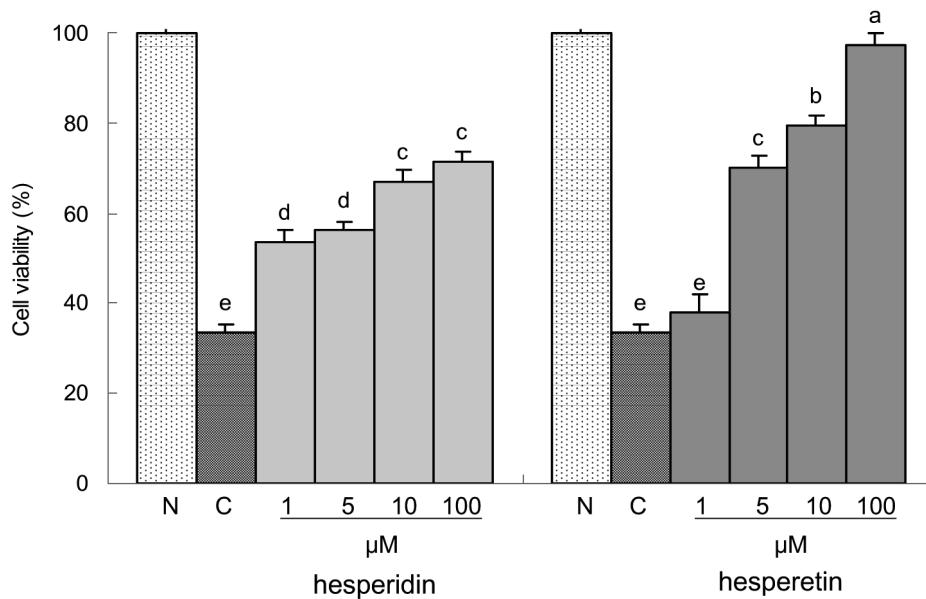


Fig. 2. Protective effect against ROO⁻-induced oxidative stress.

N: Normal; C: AAPH-treated control Values are mean \pm SD.

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

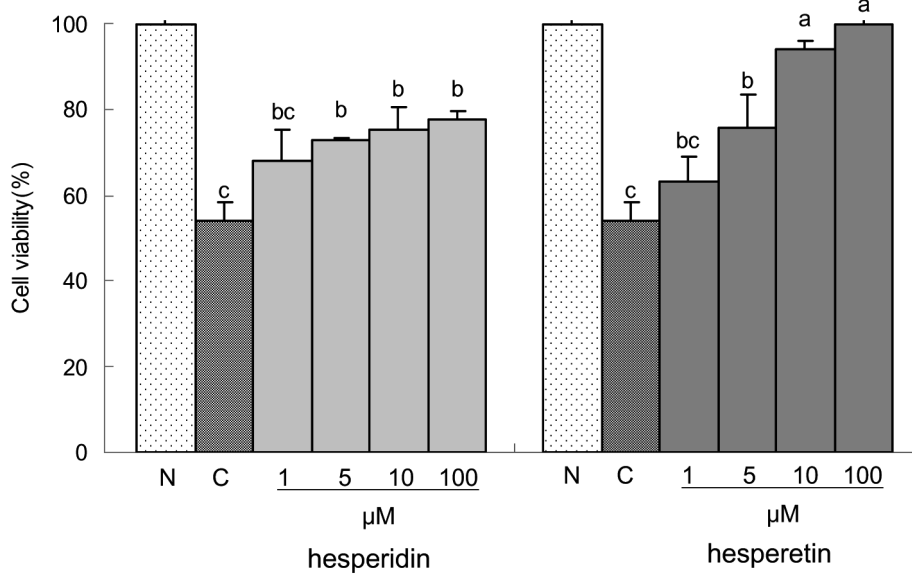


Fig. 3. Protective effect against NO-induced oxidative stress.

N: Normal; C: SNP-treated control Values are mean ± SD.

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

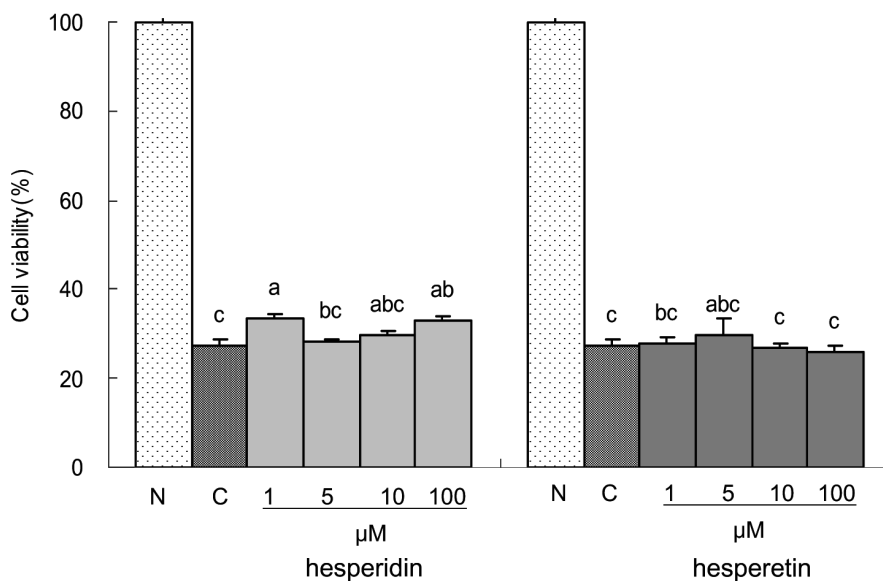


Fig. 4. Protective effect against O₂⁻ induced oxidative stress.

N: Normal; C: pyrogallol-treated control Values are mean ± SD.

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

등, 1992). 또한 SNP는 말초 혈관확장제로 임상에서 고혈압성 응급 상태의 치료제나 급성 울혈성 심부전의 ventricular unloading 등에 사용된다. SNP는 nitrosonium ion을 함유하는데 이로 인해 SNP 용액이 가시광선에 노출될 때 NO가 생성된다. 본 연구에서는 활성질소에 의한 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보기 위하여 LLC-PK₁ cell

에 SNP 처리로 NO를 유발시켜서 산화적 스트레스를 가한 후 이에 대한 hesperidin과 hesperetin의 보호 효과를 세포 생존율로 확인하였다. SNP만을 처리한 control군은 세포 생존율이 53.96%로 감소하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 확인할 수 있었고, 반면 hesperidin과 hesperetin을 농도별로 처리한 군에서는 세포 생존율이 농

도 의존적으로 상승하였으며 hesperidin보다 hesperetin이 더 높은 개선 효과를 나타내었다. 특히, hesperetin은 50 $\mu\text{mol/l}$ 에서 90% 이상의 생존율을 보여 NO의 소거를 통한 산화적 스트레스 개선 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

Pyrogallol은 O_2^- 의 생성제이며 H_2O_2 의 전구체이다. ROS는 아테롬성 동맥경화와 다른 혈관 질환의 병리적 매개 물질로 작용하는데, 특히 상피 내 O_2^- 의 생성은 정상 혈관에서 내피 의존형 이완을 감소시켜 내피 세포의 손상에 영향을 미치게 된다.

Fig. 4는 pyrogallol을 처리한 LLC-PK₁ cell에 대한 hesperidin과 hesperetin의 보호 효과를 세포 생존율로 살펴본 결과로 pyrogallol만을 처리한 control군의 경우 생존율이 33.56%로 감소하였다. 반면, hesperidin과 hesperetin을 각각 농도별로 처리한 결과 세포 생존율이 농도에 따라 약간 증가하지만, pyrogallol 처리에 의한 산화적 스트레스 개선에는 큰 효과가 나타나지 않았다.

IV. 결론

본 연구에서는 유자의 활성성분인 hesperidin과 hesperetin의 산화적 스트레스 개선 효과를 LLC-PK₁ cell을 이용하여 비교 검토하였다. Hesperidin과 hesperetin은 NO와 ROO·에 의해 유발된 산화적 스트레스에 의해 감소되어진 cell viability를 유의적으로 증가시켜 우수한 산화적 스트레스 개선 효과를 나타내었다. 특히 hesperidin의 aglycone형태인 hesperetin이 더 뛰어난 효과를 나타내었다. 반면, Hesperidin과 hesperetin은 O_2^- 에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대해서는 효과가 없었다. 따라서, 유자 활성 물질인 hesperidin과 hesperetin은 NO와 ROO·에 의해 유발된 산화적 스트레스를 개선함으로써 이로 인한 질병을 예방하는 천연 항산화제로서 역할을 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- Ahn MS, Kim HJ, Seo MS. 2007. A study on the antioxidative and antimicrobial activities of the citrus Unshiju peel extracts. Korean J. Food Culture 22: 454-461.
- Altman SA, Zastawny TH, Randers L, Lin Z, Lumpkin JA, Remacle J, Dizdaroglu M, Rao G. 1994. Tert-butyl hydroperoxide-mediated DNA base damage in cultured mediated DNA base damage in cultured mammalian cells. Mutat. Res. 306: 35-44.
- Andreoli SP, McAteer JA, Seifert SA, Kempson SA. 1993. Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK1 cells: mechanisms of injury. Am. J. Physiol. 265: 377-384.
- Bauer G. 2000. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. Anticancer Res. 20: 4115-4139.
- Brune B, Zhou J, Von KA. 2003. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. Kidney Int. Suppl. 84: 22-24.
- Calomme M, Pieters L, Vlietinck A, Berghe DV. 1996. Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. Planta Med. 62: 222-226.
- Cha JY, Kim SY, Jeong SJ, Cho YS. 1999. Effects of hesperidin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. Korean J. Life Science 9: 389-394.
- Choi EJ. 2007. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. Nutrition and cancer 59: 115-119.
- Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK. 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. Phytother Res. 15: 655-669.
- Huong DTL, Dat NT, Cai XF, Shen GH, Bae KH, Kim YH. 2004. Phenolic components from the leaves and twigs of Rhamnus taquetii. Korean J. Pharmacogn. 35: 139-142.
- Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. 1997. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61: 102-104.
- Kim J, Kim SA, Yun WK, Kim EJ, Woo MK, Lee MS. 2004. Antioxidative effect of ethanol extract for 5 kinds of spice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 524-528.
- Kobayashi S, Tanabe S. 2006. Evaluation of the anti-allergic activity of *Citrus unshiu* using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to pollen. Int. J. Mol. Med. 17: 511-515.
- Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, hearts disease, cancer. Pharmacol Rev. 52: 673-751.
- Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM. 1995. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (note II): Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. Farmco. 50: 595-599.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth

- and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Niki E. 1990. Free radical initiators as source of water-or lipid-soluble peroxy radicals. *Meth. Enzymol.* 186: 100-108.
- Nunokawa Y, Tanaka S. 1992. Interferon- γ inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 409-415.
- Oberley TD, Schultz JL, Li N, Oberley LW. 1995. Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 53-65.
- Rice-Evans C, Burdon R. 1993. Free radical-lipid interaction and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.* 32: 71-110.
- Schneider JE, Price S, Maitt L, Gutteridge JM, Floyd RA. 1990. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res.* 18: 631-635.
- So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK. 1996. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. Cancer* 26: 167-181.
- Sohn JS, Kim MK. 1998. Effects of hesperidin and naringin on antioxidative capacity in the rat. *Korean Nutr. Soc.* 31: 687-696.
- Stratton SP, Liebler DC. 1997. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochemistry* 36: 12911-12920.
- Terao K, Niki E. 1986. Damage to biological tissue induced by radical initiator 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 2: 193-201.
- Woo KL, Kim JL, Kim MC, Chang DK. 2006. Determination of flavonoid and limonoid compounds in citron (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) seeds by HPLC and HPLC/MS. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 353-358.
- Wright AW, Bubb A, Hawkins CL, Davies MJ. 2002. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem. Photobilo.* 76: 35-46.
- Yu HE, Leaniza MM, Bae YJ, Lee DH, Park JS, Kwak SH, Kim HK, Lee JS. 2005. Screening and extration condition of antiaging bioactive substances from medicinal plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1136-1142.