

Effect of *Hydropsyche kozhantschikovi* Extracts on Oxidative Stress

Young Mi Park, Jae Hwan Lim, Jong Eun Lee and Eul Won Seo*

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

Received October 11, 2012 / Revised December 18, 2012 / Accepted January 9, 2013

The present study aimed to investigate effects of ethanol extracts from *Hydropsyche kozhantschikovi* on cell and DNA damage caused by oxidative stress. In a radical scavenging assay, compared with ascorbic acid used as a control, the level of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and that of hydroxyl radicals in *H. kozhantschikovi* extracts were 60.0% and 43.7%, respectively. The ferrous iron chelating level was 37.5% compared to the chelating value of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) as a positive control at the same concentration. To verify inhibitory effects of oxidative cell damage induced by reactive oxygen species (ROS), the relative level of lipid peroxidation and the expression level of the p21 protein were compared in extracts-treated and untreated groups. Lipid peroxidation was completely inhibited in the extracts-treated group compared with the radical-only treated group. The level of p21 protein expression was restored to 92.2% of p21 protein expression in the control sample. In addition, DNA cleavage inhibition in the *H. kozhantschikovi* extracts was 74.1% compared with that of the control group, suggesting that *H. kozhantschikovi* extracts repress DNA cleavage induced by ROS. Moreover, the phosphorylation ratio of the H2AX protein was 16.7% in the radical-treated group, indicating that the ethanol extracts inhibited 83.3% of DNA damage. Our findings suggest that ethanol extracts from *H. kozhantschikovi* are effective not only in repressing the oxidation of free radicals and highly toxic hydroxyl radicals, but also in decreasing cell and DNA damage caused by oxidative stress.

Key words : Antioxidant activity, *Hydropsyche kozhantschikovi*, oxidative stress, radical

서론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 산화스트레스에 의해 생성되며, 직접적으로 지질, 단백질, DNA 등을 손상시켜 동맥경화증, 암, 노화 등 여러 질병을 유발하고 있다[23]. 이러한 산화촉진물질은 생체 내 산화억제물질과 적절한 균형을 유지하고 있으나, 흡연, 각종 환경오염물질, 알코올, 약물, 방사선, 격렬한 운동 등 여러 물리, 화학적 요인에 의해 산화촉진과 산화억제의 균형상태가 무너지게 되면 활성산소의 과다발생으로 세포 내 여러 구성성분인 지질, 단백질의 산화로 인해 다양한 퇴행성 질환의 유발되고 유전독성에 따른 생체 기능이 저하되게 된다[16, 21, 23]. 이에 따라 활성 산소를 소거할 수 있는 화합물 또는 과산화물 생성 억제 물질과 같은 항산화제들은 활성산소로 인한 산화적 손상으로부터 세포를 보호함으로써 산화스트레스에 의해 유발되는 질병의 예방 또는 치료 효과를 갖는다고 알려져 있다[8].

대부분의 항산화물질에 대한 연구는 주로 식물과 미생물 등에만 집중되고 있어 풍부한 종 다양성을 갖고 있는 곤충의 경우에는 집중적인 연구가 거의 없는 실정이다. 최근 청동풍뎅이(*Anomala albopilosa*) 추출물이 DPPH의 free radical, xanthine oxidase 및 superoxide radical에 대한 소거 활성이 높게 나타나 우수한 항산화물질을 갖고 있다고 하였으며[25], 칠성무당벌레(*Coccinella septempunctata*)를 이용하여 DPPH, FRAP, linoleic acid 산화 억제 실험을 실시한 결과 높은 항산화 활성을 보여 산업적 활용가능성이 있다고 보고된 바 있다[2]. 또한 섬서구 메뚜기(*Atractomorpha lata*)와 벼메뚜기(*Oxya japonica*) 및 끝검은 메뚜기(*Stethophyma magister*)의 항산화능과 과산화수소에 대한 세포 보호능 연구 결과, 모든 메뚜기류에서 높은 항산화·세포보호 활성이 조사되어 천연 항산화 기능성 소재로서 이용가능성이 보고된 바 있다[17].

곤충류는 외부환경의 변화에 대한 생체방어능력이 매우 발달되어 있기 때문에 곤충의 생체방어물질에 대한 탐색은 곤충이 생산하는 생리활성물질 및 신기능 생물소재 등의 개발에 매우 중요한 부분이 되고 있다. 따라서 새로운 생물자원으로 부각되고 있는 곤충류에서 새로운 생리활성물질에 대한 추적은 매우 필요한 연구 분야가 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 우리나라의 하천에 매우 풍부하게 분포하고 있으며, 수질오염에 대한 내성이 매우 강한 수서 곤충인 줄날도래(*Hydropsyche kozhantschikovi*)를 사용하여 이의 항산화능과 세포와 DNA의 산화적 손상에 따른 보호효과를 조사하였다.

*Corresponding author

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

E-mail : ewseo@andong.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

시료 추출

본 연구에 사용된 줄날도래(*Hydropsyche kozhantschikovi*)는 낙동강 상류 반변천 주변에서 채집, 동정하여 사용하였다. 줄날도래로부터 시료를 추출하기 위해 공시충 10 g에 1,000 ml의 70% ethanol을 혼합하여 25°C에서 총 3회 환류 추출 후 여과하여 농축하였다. 이를 동결 건조하여 밀봉한 다음 -70°C에 보관하면서 시료로 사용하였다.

줄날도래 추출물의 항산화활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 라디칼 제거능의 측정은 Hsu 등[3]의 방법에 따라 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, USA)로 희석한 농도별 줄날도래 추출물 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[22]. 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[3]. 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

줄날도래 추출물의 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 \times 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 측정하

였다. 이 측정치는 시료의 세포에 대한 독성을 나타내며 생존율은 시료 처리군을 대조군에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

지질과산화 억제능 분석

줄날도래 추출물이 수산화 라디칼에 의한 2차 산화물 생성에 미치는 영향을 조사하기 위한 지질과산화 억제능은 NIH 3T3 세포(2 \times 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 thiobarbituric 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[7].

DNA 손상 억제능 분석

줄날도래 추출물이 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 (100 μ g/ml) 5 μ l, 3.2, 16 and 80 μ g/ml의 시료 10 μ l, 1.5 mM FeSO₄와 6 mM H₂O₂ 5 μ l를 혼합하여 37°C에서 반응시킨 후 50% glycerol (v/v), 40 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue (Sigma, USA)를 첨가하여 전기영동 후 분석하였다.

Western blot 분석

NIH 3T3 세포(1 \times 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. 이후 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. 이후 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 실험에

서 얻어진 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계처리는 SPSS version 12.0로 분석한 후 t-검정을 실시하여 분산과 평균의 동일성 여부를 검정하였으며, 분석결과는 일원분산분석(one way ANOVA)에 의한 Duncan 검정을 실시하여 p값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

줄날도래 추출물의 항산화능

줄날도래 추출물의 항산화 활성을 분석하기 위하여 DPPH 유리 라디칼과 수산화 라디칼의 제거 활성 및 Fe²⁺-chelating 효과를 조사하였다. 줄날도래 추출물의 DPPH 유리 라디칼 제거능은 농도가 높아짐에 따라 활성이 증가하여 3.2 µg/ml에서 17.4%, 16 µg/ml에서 30.5%, 80 µg/ml에서 48.6%, 400 µg/ml에서 60.0%의 제거 효과를 나타내었다.

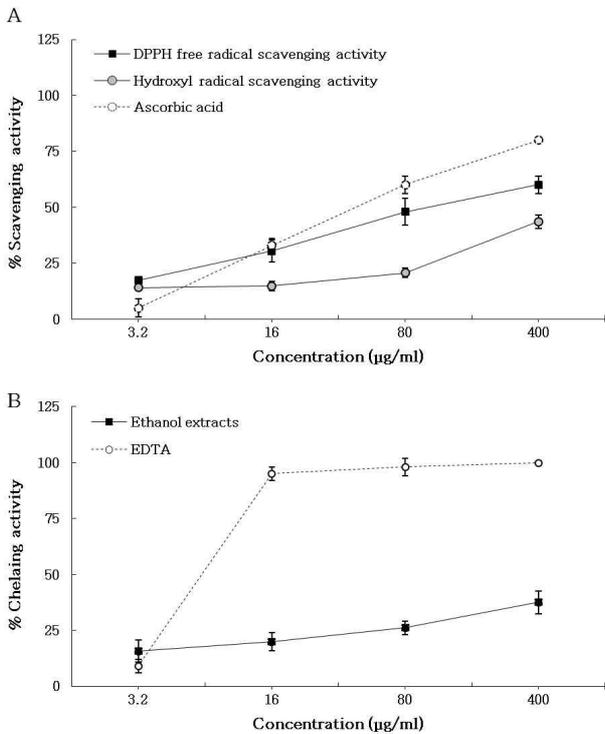


Fig. 1. (A) DPPH free radical and hydroxyl radical scavenging activities and (B) Fe²⁺-chelating activities of ethanol extracts from *H. kozhantschikovi*. (A) The DPPH free radical scavenging activity was 60.0% at 400 µg/ml. Hydroxyl-radical scavenging activity was found to be enhanced with concentration-dependent manner, exhibiting 43.7% at 400 µg/ml. Ascorbic acid was used for the positive control. (B) The Fe²⁺-chelating activity was revealed 37.5% at 400 µg/ml to the activity of EDTA. EDTA was used for the positive control. In all experiments, the absorbance values were converted to scavenging and chelating effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging and chelating activity (%) values±S.D.

ml에서 60.0%의 제거 효과를 나타내었다. 또한 수산화 라디칼 제거능은 80 µg/ml의 저농도에서는 20% 이하의 활성을 보였으나 400 µg/ml 농도에서는 43.7%의 제거 활성을 보였다(Fig. 1A). 줄날도래 추출물의 Fe²⁺-chelating 효과를 분석해 보면 3.2 µg/ml에서 15.8%, 16 µg/ml에서 20.0%, 80 µg/ml에서 26.1%, 400 µg/ml에서 37.5%로 농도가 높아질수록 활성이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1B).

줄날도래 추출물의 산화적 세포 손상 억제능

줄날도래 추출물이 세포 생존에 미치는 영향을 조사해 보면 대조군에 비해 Fe²⁺와 H₂O₂만 처리한 라디칼 처리군의 세포 생존율은 70.7%의 활성을 보여주고 있으나 시료를 처리한 실험군에서의 생존율은 3.2 µg/ml에서 87.4%, 16 µg/ml에서 93.2%, 80 µg/ml에서 96.9%로 농도가 높아짐에 따라 활성이 증가하였으나 400 µg/ml에서 72.1%로 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(data not shown). 따라서 400 µg/ml 농도의 줄날도래 추출물은 자체 독성으로 인해 세포 생존율을 감소시켰으므로 시료의 독성이 거의 없는 80 µg/ml 농도를 실험 최고 농도로 설정하여 차후 실험을 진행하였다(Fig. 2). 이러한 조건에서 지질과산화 억제능은 3.2 µg/ml에서 64.0%, 16 µg/ml에서 88.7%, 80 µg/ml에서 95.4%로 농도가 높아짐에 따라 활성이 증가하였다(Fig. 3). 또한 줄날도래 추출물이 산화적

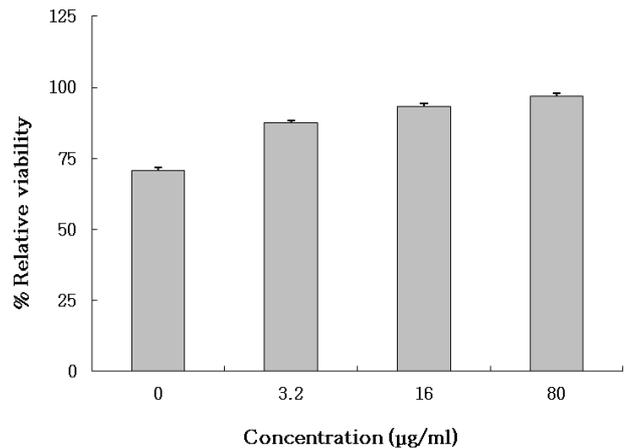


Fig. 2. The viability of NIH 3T3 cells by MTT assay. The NIH 3T3 cells (5×10³ cells/well) were cultured in 96-well plate at 37°C for 24 hr. The extracts from *H. kozhantschikovi* were treated by concentration dependent manner to each well with FeSO₄ and H₂O₂. After then 50 µl of MTT solution (1 mg/ml) was treated to each well for 4 h, and then 100 µl of DMSO was treated to each well. The observance was measured with a microplate reader at 540 nm. The cell viability of radical treated group with Fe²⁺ and H₂O₂ only was 70.7% compare to that of the radical untreated control group. However, the cell viability treated with *H. kozhantschikovi* extracts was restored to 96.9% at the concentration of 80 µg/ml treatment.

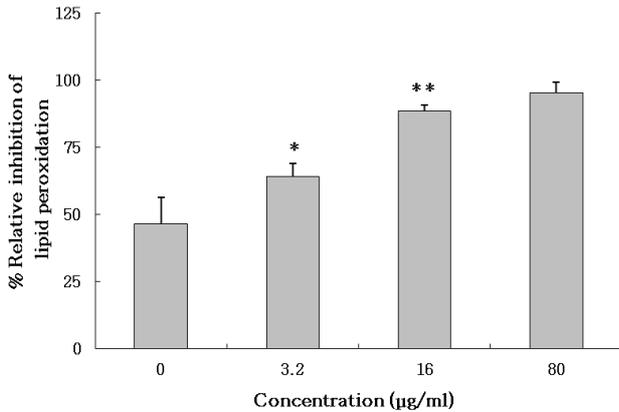


Fig. 3. The inhibition level of lipid peroxidation of the extracts from *H. kozhantschikovi* on oxidative cell damages induced by hydroxyl radical. The NIH 3T3 cells were cultured in a 6-well plate at 2×10^5 cells/well for 16 hours. After plating, the cells were treated with the varying concentration of *H. kozhantschikovi* extracts, $FeSO_4$ and H_2O_2 were added to the plate. 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. The supernatant fractions were isolated and the absorbance was measured at 532 nm. The inhibition level of lipid peroxidation was shown to 95.4% at 80 µg/ml, exhibiting an increasing tendency as the concentration rose. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicate a significant difference between the only radical treated group (treated with $FeSO_4$, H_2O_2 without extracts) and extracts-treated group (treated with $FeSO_4$, H_2O_2 and varying concentration of extracts).

세포 손상에 대한 억제능을 조사하기 위하여 줄날도래 추출물을 처리한 후 p21 단백질의 발현율을 조사해 보면 3.2 µg/ml에서 36.7%, 16 µg/ml에서 82.1%, 80 µg/ml에서 92.2%로 나타나 농도가 높아질수록 대조군 수준으로 회복되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

줄날도래 추출물의 산화적 DNA 손상 억제능

줄날도래 추출물이 산화적 스트레스에 의해 유발되는 DNA 손상에 미치는 영향을 조사해보면, 대조군인 Ψ X-174 RF I plasmid DNA는 supercoiled (SC) DNA로 확인되고 있으나, Fe^{2+} 와 H_2O_2 만 처리한 라디칼 처리군에서는 DNA의 분절로 인하여 open circular (OC) DNA로 전환되고 있다. 이러한 조건에서 줄날도래 추출물을 처리하면 supercoiled DNA는 3.2 µg/ml에서 30.3%, 16 µg/ml에서 40.5%, 80 µg/ml에서 74.1%로 조사되어 시료의 농도가 높아질수록 supercoiled DNA로부터 open circular DNA로 전환되는 것을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 줄날도래 추출물이 DNA 손상에 미치는 항산화 효과를 조사하기 위하여 H2AX 단백질의 인산화비를 분석하였다. 줄날도래 추출물 처리에 따른 phospho-H2AX 발현

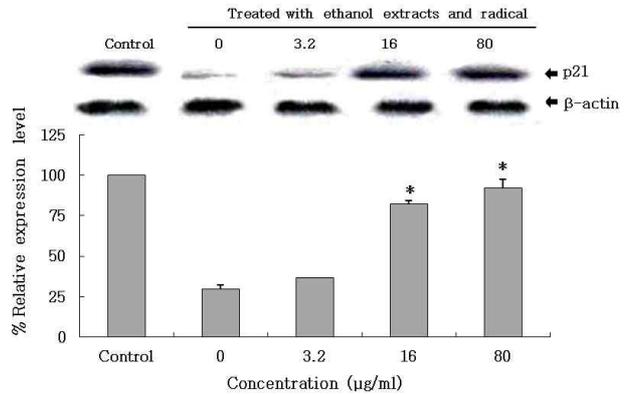


Fig. 4. The expression level of *H. kozhantschikovi* extracts on p21 protein. Lane 1 is control and lane 2 is treated with only radical treated group. Lanes 3-6 were treated with varying concentration of extracts (3.2, 16 and 80 µg/ml). The level of p21 expression was measured by western blot analysis. The level of p21 expression showed 12.5% in radical treated group with Fe^{2+} and H_2O_2 only. On the other hand, the amounts of expression of p21 were increased from 36.7% to 92.2% at 80 µg/ml in *H. kozhantschikovi* extracts treated group. * $p < 0.05$ indicate significant difference between the only radical treated group and extracts-treated group.

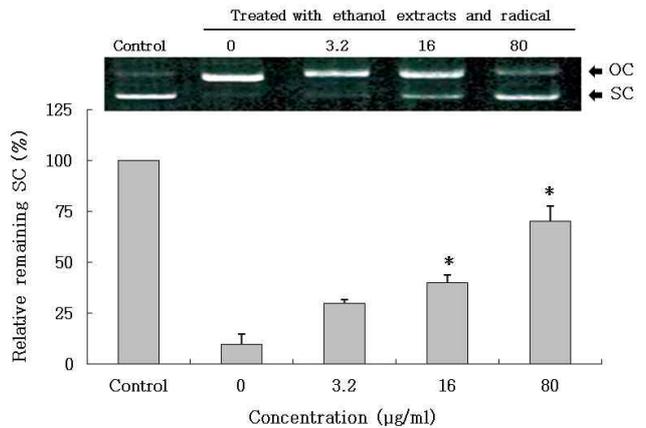


Fig. 5. The effects of *H. kozhantschikovi* extracts on supercoiled DNA and open circular DNA of the Ψ X-174 RF I plasmid DNA by hydroxyl radical. Lane 1 is control group and lane 2 is only radical treated group. Lanes 3-6 were treated with varying concentration of the extract (3.2, 16 and 80 µg/ml). The Ψ X-174 RF I plasmid DNA was identified as supercoiled DNA in the control group. In contrast, the supercoiled plasmid DNA had transformed to open circular DNA due to DNA segmentation in radical treated group with Fe^{2+} and H_2O_2 . * $p < 0.05$ indicate significant difference between the radical treated group and extracts-treated group.

수준은 Fe^{2+} 와 H_2O_2 만을 처리한 라디칼 처리군에 비해 3.2 µg/ml에서 82.2%, 16 µg/ml에서 36.7%, 80 µg/ml에서 16.7%

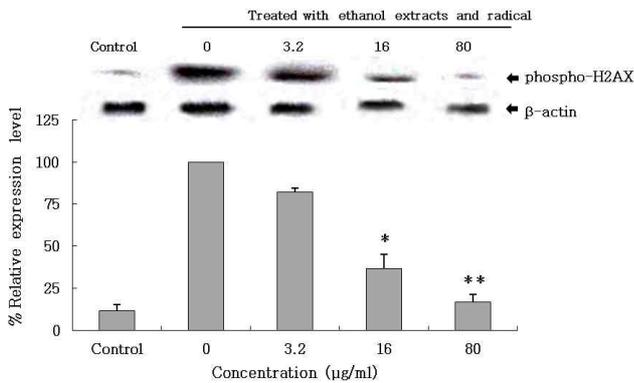


Fig. 6. Expression level of *H. kozhantschikovi* extracts on H2AX induced by hydroxyl radical. Lane 1 is control group and lane 2 is only radical treated group. Lanes 3-6 were treated with varying concentration of the extracts. The phosphorylation ratio of H2AX over different concentration of extracts were 82.2% at 3.2 µg/ml, 36.7% at 16 µg/ml, and 16.7% at 80 µg/ml compared to those ratio in negative control treated with Fe²⁺ and H₂O₂. The occurrence of DNA damage was inhibited in NIH 3T3 chromosome when extracts treated, with approximately 83.3% comparing to radical treated group. **p*<0.05, ***p*<0.01 indicate a significant difference between only radical treated group and extracts-treated group.

로 나타나 시료의 농도가 높아짐에 따라 인산화비는 감소하는 경향을 보여주고 있다(Fig. 6). 이러한 결과는 줄날도래 추출물 시료의 농도가 높아질수록 phospho-H2AX 발현을 억제하는 것으로 DNA 손상은 라디칼 처리군에 비해 역으로 줄날도래 추출물 시료의 농도가 80 µg/ml 인 경우 약 83.3%의 억제 효과를 나타내는 것으로 분석되었다.

고 찰

호기성 생물의 호흡과정으로 체내에 유입된 산소는 대사 과정에서 활성산소를 생성하게 되는데, 이러한 활성산소는 반응성이 매우 크기 때문에 세포막과 단백질의 분해, 지질과산화, DNA 손상 등 체내 조직 및 기관에 산화적 스트레스를 일으켜 노화와 질병의 발생을 야기한다. 또한 Fe²⁺는 체내의 과산화수소에 의한 Fenton 반응으로 hydroxyl 라디칼과 같은 활성산소의 생성을 촉진하여 체내 산화를 야기한다[13]. 따라서 산화적 반응을 억제하거나 감소시키는 항산화능은 호기성 생물의 노화와 질병에 관련되어 매우 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구에서는 줄날도래 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 농도에 따른 DPPH 유리 라디칼과 수산화 라디칼 제거능 및 Fe²⁺-chelating 효과를 분석하였다. 최근 연구에 따르면 사마귀(*Tenodera angustipennis* Saussure)와 늦반딧불이(*Pyrocoela rupa* Olivier) 메탄올 추출물의 DPPH 유리 라디칼 소거능은 약 200 mg/ml의 농도에서 80%로 나타났으며, 산제

비나비(*Papilio maackii* Mntris)와 팔중이(*Oedaleus infernalis* Saussure) 추출물은 70% 이상의 DPPH 유리 라디칼 제거 활성을 보여 우수한 항산화 효과를 가진다고 보고된 바 있다[15]. 또한 오미자(*Schizandra chinensis*)의 초임계 추출물과 초임계 후 에탄올 추출물의 Fe²⁺-chelating 효과는 200 µg/ml에서 각각 17.44%, 23.65%로 나타나 초임계 후 에탄올 추출물은 유리 라디칼의 생성을 억제하는 데 효과적이며[19], 복분자(*Rubus coreanus*) 추출물의 Fe²⁺-chelating 효과는 물 추출물에서 2.71~7.37%, 메탄올 추출물에서 5.50~6.64%로 나타나 뚜렷한 활성을 보이지 않는다고 보고된 바 있다[14]. 본 연구에서도 줄날도래 추출물의 DPPH 유리 라디칼과 수산화 라디칼 제거능은 각각 60.0%, 43.7%의 활성을 보였으며 Fe²⁺-chelating 효과는 37.5%로 나타났다. 따라서 줄날도래 추출물은 체내 대사 과정에서 생성되는 유리 라디칼을 제거하고 Fe²⁺의 Fenton 반응을 억제하여 활성산소의 생성을 감소시키는 데 효과적인 것으로 생각된다.

산화적 대사 과정에 의해서 유발되는 산화적 스트레스는 여러 가지 질병과 세포사멸에 중요한 역할을 한다. 세포가 활성산소에 노출되었을 때 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화효소가 활성화되어 세포 내 산화적 스트레스가 제거된다. 그러나 활성산소의 발생과 항산화효소의 활성 사이에 균형이 깨지면 염증, 암 발생 및 노화가 가속화되기도 한다[10, 11]. 산화적 스트레스에 대한 기존의 연구에서 Jeong 등[5]은 백작약(*Paeonia japonica*)의 열수 추출물로부터 지질과산화 억제능을 측정된 결과 50 µg/ml의 농도에서 62%로 나타나 산화적 스트레스를 감소시킬 것이라고 한 바 있으며, Park 등[18]은 팔(*Phaseolus angularis*) 열수 추출물의 지질과산화 억제율이 200 µg/ml에서 91.2%로 확인되고 있어 산화적 세포 손상을 감소시키는 데 효과적이라 한 바 있다. 또한 Park 등[20]은 국화(*Dendrathera indicum*) 추출물이 산화적 스트레스에 의한 p21 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 200 µg/ml 농도에서 79.6%로 나타나 세포 손상을 억제하는 데 효과적이라 한 바 있으며, Kim 등[9]은 동충하초(*Cordyceps militaris*) 열수 추출물의 경우 인체 간암세포주인 HepG2 세포의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 처리 농도가 높아짐에 따라 p21의 발현 증가가 관찰되어 간암세포의 증식 억제에 연관성을 지닐 수 있다고 보고한 바 있다. 본 연구에서 줄날도래 추출물이 세포의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사한 결과 라디칼 처리군의 세포는 70.7%의 생존율을 보여주고 있으나, 시료를 처리한 실험군에서는 96.9%의 세포 생존율을 나타내주고 있어 세포에 대한 줄날도래 추출물의 독성은 거의 없는 것으로 조사되었다. 또한 라디칼에 의한 지질과산화 반응에서 줄날도래 추출물은 95% 이상에 해당하는 억제 활성을 보였으며 세포의 비정상적 증식을 억제하는 p21 단백질의 발현을 증가시켜 주고 있어 본 연구의 줄날도래 추출물은 산화적 스트레스로부터 세포의 손상을 감소시키는 데

효과적인 것으로 생각된다.

활성산소에 의해 야기되는 산화적 스트레스는 DNA의 분절을 유발하기 때문에 유전정보가 손상되어 생체기능을 저하시키는 유전 독성의 원인이 되기도 한다[24]. 활성산소에 의한 산화적 손상에 있어서 생체고분자 중 DNA는 가장 민감한 biotarget이다[12]. 일반적으로 plasmid DNA는 이중나선 구조 전체가 꼬인 구조인 supercoiled (SC) DNA 형태로 존재하고 있으나 활성산소와 같은 외부 요인이나 효소 작용에 의하여 두 사슬 DNA의 한 쪽 또는 양쪽 사슬의 국소적인 부위가 절단된 open circular (OC) DNA 형태로 전환된다. 활성산소에 의한 DNA의 손상은 암을 유발할 수 있고 파킨슨병과 알츠하이머성 치매 등과 같은 퇴행성 신경질환의 발병에 있어서도 특징적인 결과이다. ROS 중에서도 hydroxyl radical은 생리학적으로 가장 중요한 DNA 손상 물질로 알려져 있다[26]. DNA에 유발된 산화적 손상의 축적은 정상세포를 형질전환세포로 전환시키는 발암 개시점으로 작용하기 때문에 항산화능 분석에 있어 DNA의 산화적 손상에 대한 억제력 평가는 매우 중요한 의미를 지닌다. 최근 연구에서 천궁(*Chicidium officinale*)의 80% 에탄올 추출물은 NIH 3T3 세포에 처리한 결과 시료의 농도가 높아짐에 따라 DNA 분절이 감소한다고 한 바 있으며[6], 밀몽화(*Buddleja officinalis*) 추출물은 산화적 DNA 손상 분석에서 supercoiled DNA가 open circular DNA로 전환되는 것을 80% 억제하여 DNA 분절의 감소에 효과적이라고 보고된 바 있다[1]. 또한 Jeong 등[4]에 의하면 보리(*Hordeum vulgare*) 씨앗에서 정제된 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 DNA에 대한 H2AX의 인산화비 억제율은 200 µg/ml에서 80%로 나타난다고 보고되었다. 본 연구의 줄날도래 추출물은 supercoiled DNA로부터 open circular DNA로 전환되는 것을 74.1% 감소시켰으며 phospho-H2AX의 발현을 83.3%의 억제하였으므로 활성산소에 의한 DNA의 분절과 인산화를 억제하는 데 효과적인 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면 줄날도래 추출물은 산화적 스트레스를 유발하는 유리 라디칼과 생체 내 강한 독성을 나타내는 수산화 라디칼을 제거하는 데 매우 효과적인 것으로 나타났다. 또한 $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , ROO^{\cdot} 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 미루어보아 줄날도래 추출물은 산화적 스트레스로 인한 생체 독성으로부터 세포와 DNA를 보호하는 데 효과적인 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 안동대학교 산학연구비 지원사업에 의

하여 연구되었음.

References

- Hong, S. C., Jeong, J. B. and Jeong, J. H. 2008. *Buddleja officinalis* prevents the normal cells from oxidative damage via antioxidant activity. *Korean J Plant Res* **21**, 449-456.
- Heo, J. C., Park, J. Y., Hwang, J. S., Park, H. C., Kang, S. W., Hwang, S. J., Yun, C. Y., Kwon, T. K. and Lee, S. H. 2006. Comparison of *in vitro* antioxidant activity and Cyclooxygenase-2 promoter inhibitory activity in *Harmonia axyridis* Pallas and *Coccinella septempunctata* Linne. *Korean J Food Preserv* **13**, 513-518.
- Hsu, B., Coupar, I. M. and Ng, K. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem* **98**, 317-328.
- Jeong, J. B., Hong, S. C. and Jeong, H. J. 2009a. 3, 4-Dihydroxybenzaldehyde purified from the barley seeds (*Hordeum vulgare*) inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via its antioxidant activity. *Phytomedicine* **16**, 85-94.
- Jeong, I. Y., Lee, J. S., Oh, H., Jeong, U. H., Park, H. R. and Jo, S. K. 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.
- Jeong, J. B., Park, J. H., Lee, H. K., Ju, S. Y., Hong, S. C., Lee, J. R., Chung, G. Y., Lim, J. H. and Jeong, H. J. 2009. Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect. *Food Chem Toxicol* **47**, 525-529.
- Kang, K. A., Zhang, R., Piao, M. J., Ko, D. O., Wang, Z. H., Kim, B. J., Park, J. W., Kim, H. S., Kim, D. H. and Hyun, J. W. 2008. Protective effect of irisolidone, a metabolite of kakkalide, against hydrogen peroxide induced cell damage via antioxidant effect. *Bioorg Med Chem* **16**, 1133-1141.
- Kim, J. W., Moon, B. S., Park, Y. M., Yoo, N. H., Ryoo, I. J., Nguyen, T. C., Yoo, I. D. and Kim, J. P. 2005. Structures and antioxidant activity of diketopiperazines isolated from the mushroom *Sarcodon aspratus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **48**, 93-97.
- Kim, K. M., Park, C., Choi, Y. H. and Lee, W. H. 2008. Induction of apoptosis by water extract of *Cordyceps militaris* (WECM) in human hepatocellular carcinoma HepG2 Cells. *J Life Sci* **18**, 804-813.
- Lightfoot, T., Skibola, C. F., Smith, A. G., Forrest, M. S., Adamson, P. J., Morgan, G. J., Bracci, P. M., Roman, E., Smith, M. T. and Holly, E. Z. 2006. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* **91**, 1222-1227.
- Looi, M. L., Mohd Dali, A. Z., Md Ali, S. A., Wan Ngah, W. Z. and Mohd Yusof, Y. A. 2008. Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. *Eur J Cancer Prev* **17**, 555-560.
- Martinez, G. R., Loureiro, A. P. M., Marques, S. A.,

- Miyamoto, S., Yamaguchi, L. F., Onuki, J., Almeida, E. A., Garcia, C. C. M., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H. G. and Di Mascio, P. 2003. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res* **544**, 115-127.
12. McKee, T. and McKee, J. R. 2002. *Biochemistry: the molecular basis of life*. McGraw-Hill, New York.
13. Park, S. Y. and Chin, K. B. 2007. Evaluation of antioxidant activity in pork patties containing bokbunja (*Rubus coreanus*) extract. *Korean J Food Sci Ani Resour* **27**, 432-439.
14. Park, J. Y., Heo, J. C., An, S. M., Yun, E. Y., Han, S. M., Hwang, J. S., Kang, S. W., Yun, C. Y. and Lee, S. H. 2005. High throughput-compatible screening of anti-oxidative substances by insect extract library. *Korean J Food Preserv* **12**, 482-488.
15. Park, M. H., Kang, S. M., Jung, H. Y. and Hong, S. G. 2003. Protecting effects of vitamin E against immobilization stress-induced oxidative damage in rat brain. *Korean J Nutr* **36**, 570-576.
16. Park, J. Y., Heo, J. C., Woo, S. U., Yun, C. Y., Kang, S. W., Hwang, J. S. and Lee, S. H. 2006. Anti-inflammatory and cellular protective effects on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of grasshopper extracts. *Korean J Food Preserv* **13**, 796-802.
17. Park, Y. M., Jeong, J. B., Seo, J. H., Lim, J. H., Jeong, H. J. and Seo, E. W. 2011. Inhibitory effect of red bean (*Phaseolus angularis*) hot water extracts on oxidative DNA and cell damage. *Korean J Plant Res* **24**, 130-138.
18. Park, Y. M., Lim, J. H., Jeong, H. J. and Seo, E. W. 2011. Effect of *Schizandra chinensis* extracts on oxidative damage. *J Exp Biomed Sci* **17**, 69-77.
19. Park, Y. M., Kim, J. I., Lee, C. H., Lim, J. H. and Seo, E. W. 2011. Effect of *Dendranthema indicum* extracts on cell and DNA damage induced by oxidative stress. *J Life Sci* **21**, 1698-1704.
20. PUNCHARD, N. A. and KELLY, F. J. 1996. A practical approach, pp. 1-8, In PUNCHARD, N. A. and F. J. KELLY (eds.), *Free radicals*. Oxford University Press, New York.
21. Smirnov, N. and Cumbes, Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057-1060.
22. Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, 1005-1029.
23. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44-84.
24. Yoon, W. J., Lee, J. A., Kim, J. Y., Kim, S. B. and Park, S. Y. 2007. Antioxidant activity and physiological function of the *Anomala albopilosa* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **36**, 670-677.
25. You, H. J., Oh, D. H., Choi, C. Y., Lee, D. G., Hahm, K. S., Moon, A. R. and Jeong, H. G. 2002. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 33-38.

초록 : 줄날도래 추출물이 산화적 스트레스에 미치는 영향

박영미 · 임재환 · 이종은 · 서울원*

(안동대학교 자연과학대학 생명과학과)

본 연구는 줄날도래(*Hydropsyche kozhantschikovi*) 에탄올 추출물이 산화적 스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위해 활성산소에 의한 세포와 DNA의 손상 억제력을 조사하였다. 줄날도래 에탄올 추출물의 DPPH 유리 라디칼과 수산화 라디칼 제거능은 대조군에 비해 각각 60.4%, 60.0%로 나타났으며, Fe²⁺-chelating 효과는 37.5%로 조사되었다. 줄날도래 추출물이 활성산소에 의해 유도되는 세포손상에 미치는 억제 효과를 조사하기 위해 지질과산화의 상대적 수준과 p21 단백질의 발현율을 해보면 줄날도래 추출물은 라디칼 처리군에 비해 지질과산화를 거의 완벽하게 억제하고 있으며, p21 단백질의 발현은 대조군의 92.2%로 회복되는 것으로 조사되었다. 또한 줄날도래 추출물의 DNA 분절화 억제 활성은 대조군에 비해 74.1%로 나타나 산화적 스트레스에 의해 유발되는 DNA 분절화를 효율적으로 억제하고 있으며, H2AX 단백질의 인산화비는 라디칼 처리군의 16.7%에 해당하는 수준으로 조사되어 줄날도래 추출물은 히스톤 단백질의 인산화를 83.3% 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 보아 줄날도래 추출물은 활성산소에 대한 항산화 효과 뿐만 아니라 세포와 DNA의 손상을 억제하는데 효과적인 것으로 사료된다.