

Cytoprotective Effects and Gene Expression Patterns Observed Based on the Antioxidant Activity of *Lonicera japonica* Extract

Won June Cho¹, Hee Seung Yoon¹, Yong Hyun Kim², Jung Min Kim³, Il Jae Yoo⁴, Man-Deuk Han² and In Seok Bang^{1*}

¹Department of Biological Science and the Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²Department of Biology, Soochunhyang University, Asan 350-646, Korea

³NAR Center, Inc., Daejeon Oriental Hospital of Daejeon University, Daejeon 301-724, Korea

⁴Institute of Nanoprocess Safety Research, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Received July 1, 2013 / Revised August 6, 2013 / Accepted August 20, 2013

In this study, based on the antioxidative effects in organic solvent fractions obtained from the main methanolic extract of *L. japonica*, the protective cellular effects and gene expression patterns of ethyl acetate fractions on H₂O₂-induced Raw 264.7 cell death (IC₅₀) were analyzed. The antioxidant activity of the fractions measured using DPPH free radical scavenging activity increased in a dose-dependent manner, and the ED₅₀ exhibited the highest 39.56 µg/ml in the ethyl acetate fraction. In addition, the ethyl acetate fractions' cell viability on H₂O₂-induced Raw 264.7 cell damage increased in a concentration-dependent manner, showed a visible cell survival rate of 82.49% at a concentration of 100 µg/ml. The gene expression patterns related to the ethyl acetate fractions' cytoprotective effect in H₂O₂-induced Raw 264.7 cell damage presented similar patterns to those of BHA. In comparative analysis for antioxidant activity-related genes affected by ethyl acetate fractions and BHA in H₂O₂-induced Raw 264.7 cells, both ethyl acetate fractions and BHA showed very similar gene expression patterns, but the gene expression level of the heme oxygenase 1 (Hmox1) gene making antioxidant enzymes in cells was four times higher in ethyl acetate fractions than BHA. In inflammation-related genes in H₂O₂-induced Raw 264.7 cells, the T-box transcription factor (Tbx21) gene was expressed about two times more frequently in the ethyl acetate fraction treatment group, while it was expressed half as frequently in the BHA treatment group.

Key words : *Lonicera japonica*, antioxidant activity, inflammation, gene expression

서 론

모든 생물체는 생체 내에서 에너지 생산을 위한 산소 이용 과정에서 유해산소로 알려져 있는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생성한다[6]. ROS는 가장 안정한 형태인 삼중항산소(³O₂)가 환원되면서 생성되는 superoxide anion (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (·OH), singlet oxygen (¹O₂)이나 hydroperoxide (ROOH)에서 생기는 자유라디칼(free radical; ROO·, RO·) 등으로 생체 내 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase와 같은 효소의 항산화 기작에 의해 대부분 소멸된다[7, 12, 15]. 그러나 이들 ROS가 정상적으로 소거되지 않을 때 자유라디칼로 인한 산화적 스트

레스가 세포나 세포소기관의 막지질 과산화에 의한 막 또는 소기관의 손상, 효소 단백질의 아미노산 잔기의 산화를 통한 비가역적 불활성화, 핵산 염기의 변형 및 산화적 분해 절단을 통한 DNA 손상을 유도한다[5, 21].

최근 노화는 물론 성인병과 암을 비롯하여 각종 질환의 원인이 ROS에 기인된 것이라는 학설이 점차 인정되어짐에 따라 ROS를 조절할 수 있는 물질인 항산화제(antioxidant)에 대한 관심이 증대되고 있다[18]. ROS의 독성을 억제하기 위한 항산화제로는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제와 tocopherol과 같은 천연 항산화제가 있다. Tocopherol은 천연 항산화제이지만 가격이 높고, BHA와 BHT는 우수한 항산화 능력을 보이고 있지만 과량으로 섭취할 경우 암 유발 가능성 등의 안정성이 논란이 되고 있다[14]. 따라서 생체 내 항산화 방어계를 증가시키거나 ROS를 조절할 수 있는 합성 또는 천연 항산화제 개발 연구의 필요성이 강조되고 있고 이에 대한 탐색이 활발히 진행되고 있다[10, 22]. 특히 천연 식물의 추출물은 여러 약리적 효능과 더불어 항산화제로 작용을 할 수 있는 생리활성 물질이 있어 유용한 연구 재료가 되고 있으나[13], 이러한 천연 식물의 추출물에 의한 생체 내 항산화 효소의 유전자 발현과

*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9595, Fax : +82-41-548-6231

E-mail : isbang@hoseo.edu

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.

이들 유전자의 발현 및 조절을 위한 특정 유전자의 발현 양상에 대한 연구는 미비한 실정이다.

금은화(*Lonicera flos*)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴(*Lonicera flos* Thunberg)의 꽃으로서 오래 전부터 동양의학에서 청열해독(淸熱解毒), 양산풍열(涼散風熱) 등의 효능이 있어 소염(消炎), 청혈(淸血), 이뇨(利尿), 살균(殺菌) 작용을 나타내어 열성병(熱性病), 신열무한(身熱無汗), 화농성질환(化膿性疾患), 급만성임질(急性慢性淋疾), 매독(梅毒), 이질(痢疾), 농양(膿瘍), 옹저(癰疽), 개선종독악창(疥癬腫毒惡瘡), 인후종통(咽喉腫痛)을 치료하는데 사용되어 왔다[8]. 금은화에 대한 최근의 연구동향 분석에 따르면 항염증, 독성학 및 간손상, 호흡기 관련, 피부 관련, 항바이러스 및 항균 효과, 항산화 효과, 항암 효과의 연구가 있으며, 그 외 코카인 중독, 막성신증, 망막허혈 및 혈소판 활성화 연구 등에 이르기까지 폭넓은 분야에 걸쳐 연구가 이루어지고 있다[9]. 이와 같이 금은화를 비롯한 약용식물은 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있어 오래 동안 질병 치료와 예방의 목적으로 사용해 왔으며, 생약 개발의 기초적인 정보뿐만 아니라 현대 의약품의 발견에 주요한 소재로 활용되고 있다[3].

본 연구는 금은화의 메탄올(methanol, MeOH) 추출에 의한 유기 용매별 분획에서 항산화 효과와 Raw 264.7 세포에서 H₂O₂에 의한 ROS의 세포보호 효과를 확인하였으며, 세포 보호효과가 확인된 Raw 264.7 세포에서 항산화 활성 및 항염증 반응에 관여하는 유전자 발현 양상을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료의 추출 및 분획

건조된 상태로 구입한 금은화 200 g에 1 liter의 메탄올을 가하여 상온에서 24 시간씩 교반하면서 3 회 반복 추출한 후, 여과시켜 80°C 항온수조(Oilbath, Switzerland)에서 회전 감압 농축기(Rotavapor, Switzerland)로 감압하여 메탄올 추출물 20.97 g을 얻었다. 메탄올 추출물, 증류수 그리고 헥산(*n*-hexane)을 1:9:10의 비율로 혼합하여 물 층과 분획 용매가 두 층으로 나뉘도록 방치하여 3회 분획된 헥산 가용부를 감압 농축하여 헥산 분획 0.176 g을 얻었다. 계속하여 잔류층인 물 층을 클로르포름(chloroform, CHCl₃), 에틸 아세테이트(ethyl acetate, EtOAc), 부탄올(*n*-butanol, *n*-BuOH), 물(water) 순으로 각각 3 회씩 용매의 극성을 이용한 순차적 분획으로 0.392 g, 2.892 g, 6.185 g 그리고 3.762 g의 분획물 각각을 얻었다(Fig. 1).

세포배양

생쥐 대식 세포주(Raw 264.7)를 한국세포주은행(Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% 항생제(streptomycin/penicillin)가 포함된

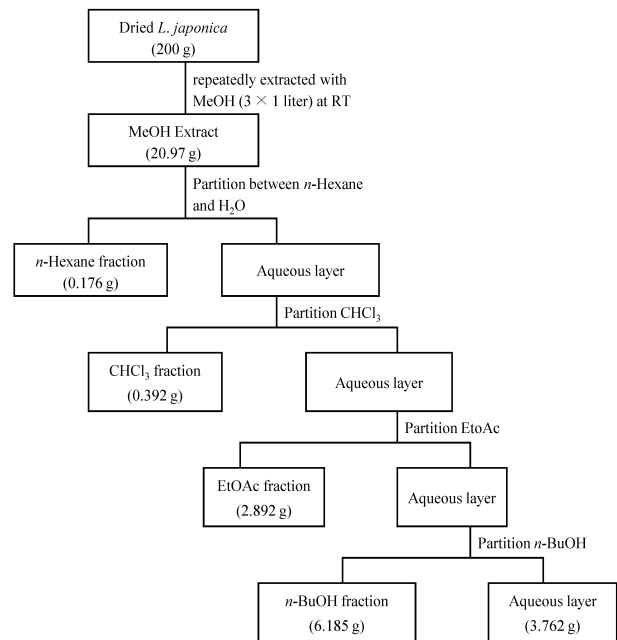


Fig. 1. Schematic diagram of extraction and fractionation of *L. japonica*.

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) 배지를 사용하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 실험 시 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척 후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 37°C, CO₂ 배양기에서 5분 동안 반응 후에 DMEM 배지를 넣어 효소를 불활성시키고 15 ml conical tube로 옮긴 후 800 rpm에서 2분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 이어서 새로운 DMEM 배지로 재 부유하여 tryphan blue로 염색하여 세포수를 1×10⁶ cell/ml로 조절하여 사용하였다.

DPPH 자유라디칼 소거활성

금은화의 메탄올 추출에 의한 극성별 분획의 항산화 활성은 DPPH (1,1-dipheyl-2-piclyl-hydrazyl)의 자유라디칼 소거효과 (free radical scavenging effect)를 측정하는 Blois [1]의 방법에 따라 측정하였다. 메탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 900 µl에 메탄올에 용해시킨 각 분획의 농도별 시료 100 µl를 혼합하여 실온에서 30 분 동안 암실에서 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물로는 BHA를 사용하였고, 시료의 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 다음의 식으로 계산하였다.

$$EDA (\%) = (1-A/B) \times 100$$

A: 517 nm에서의 시료첨가구의 흡광도

B: 517 nm에서의 무첨가구의 흡광도

각 분획의 EDA(%) 값을 바탕으로 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양 ED₅₀ (µg/ml)을 구하고, BHA와 비교하여 항산화 활성을 검정하였다.

Raw 264.7 세포에 대한 금은화 추출 분획 및 H₂O₂의 세포독성

조절된 Raw 264.7 세포를 96 well plate에 100 μ l 씩 분주하여 4 시간 동안 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 세포를 부착 시킨 후, 금은화 추출물 각 분획을 농도별로 10 μ l 씩 첨가하여 24 시간 동안 배양하여 세포 생존율을 아래의 MTT assay (Sigma, USA) 방법으로 측정하였다. 또한 분주한 Raw 264.7 세포에 10~100 μ M의 H₂O₂를 4시간 처리하여 MTT assay로 분석하여 H₂O₂에 의해 50%의 세포 사멸을 보이는 산화 스트레스의 조건(IC₅₀)을 설정하였다.

H₂O₂에 의한 금은화 추출 분획의 세포보호 효과

DPPH 자유라디칼 소거활성이 높게 나타난 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획의 H₂O₂에 대한 Raw 264.7 세포 보호 효과를 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 접종한 후, 농도별 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획을 처리하고 1시간 후 설정된 IC₅₀ (50 μ M) 농도의 H₂O₂를 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 양성 대조군으로 BHA를 세포에 동일하게 처리하였으며, MTT assay로 세포 생존율을 측정하여 세포 보호 효과를 확인하였다.

MTT assay

Raw 264.7 세포에 대한 금은화 추출 각 분획 및 H₂O₂의 세포독성, 에틸 아세테이트 분획의 H₂O₂로부터의 세포보호 효과를 MTT assay로 측정하였다. 시료 처리된 세포 각각의 well에 MTT 용액(5 mg/ml)을 10 μ l 씩 처리한 후 37°C에서 4시간 동안 배양하여 상등액을 제거하였다. 형성된 MTT formazan 결정체를 dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μ l에 용해시켜 ELISA reader (Molecular devices, USA)로 formazan의 흡광도가 최대가 되는 540 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Microarray analysis

세포보호 효과가 확인된 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획 100 μ g/ml 및 양성 대조군으로 동량의 BHA가 각각 처리된 Raw 264.7 세포를 1 시간 배양한 후, IC₅₀ 농도의 H₂O₂를 처리하여 4 시간 동안 배양하여 상등액을 제거하고 TRIzol® REAGENT (Invitrogen, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA 정량 및 정성분석은 RNA nano kit (2100 Bioanalyzer System, Agilent Technologies, USA)를 사용하였으며, migration 및 peak pattern, 28S/18S ribosomal RNA의 비율 등을 고려한 RIN(RNA Integrity Number) 값은 9.5 이상이었다. 각 total RNA로부터 target cRNA의 합성(amplification and labeling) 및 혼성화 반응(nucleic acid hybridization)은 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS

(Agilent Technology)를 이용하여 수행하였다. H₂O₂에 의한 산화 스트레스(IC₅₀)가 유도된 음성 대조군 시료는 cyanine 3, 실험군으로 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획에 의한 H₂O₂로부터 세포보호 효과 또는 BHA의 H₂O₂로부터 세포보호 효과 시료는 cyanine 5로 각각 증폭 및 라벨시켰다. 증폭 및 라벨된 cRNA는 RNase Mini Spin Columns (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하고, ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 정량하였다. 750 ng cRNA를 이용하여 hybridization buffer를 만들고 Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarray (44K)에서 혼성화 반응을 실시하였다. Hybridization image는 Agilent DNA microarray Scanner를 이용하여 스캔하였으며, 데이터 quantification은 Agilent Feature Extraction software를 이용하였다. 모든 데이터의 normalization (LOWESS)과 fold-changed gene의 선택은 GeneSpring GX 7.3 (Agilent Technology)으로 수행하였다. 각 실험군에서 flag-out gene들은 제거하였으며, normalized ratio는 signal channel intensity 중간값을 control channel intensity 중간값으로 나누어 산출하였다. Gene selection을 위한 functional annotation은 Gene Ontology™ Consortium (<http://www.geneontology.org/index.shtml>) DB 정보를 따랐으며, GeneCards (<http://www.genecards.org/>), DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), 그리고 Medline databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 이용하여 기능연구를 위한 데이터 mining을 수행하였다.

통계처리

실험결과는 SPSS program (ver. 12.0.01)을 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고 통계적 유의성 검정은 분산분석(ANOVA test)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Tukey's test를 이용하여 상호검정하였다.

결과 및 고찰

금은화 추출 분획의 수율

금은화 200 g에서 얻어진 19.61 g의 메탄올 추출물로부터 헥산, 클로르포름, 에틸 아세테이트, 부탄올, 및 열수로 유기용매의 극성이 낮은 것부터 높은 순서로 순차 분획하였다. 각 분획의 수율은 부탄올 1.09, 헥산 0.39, 클로르포름 0.25 그리고 에틸 아세테이트 분획에서 0.19%의 가장 낮은 수율 및 열수 분획에서 8.38%의 가장 높은 수율을 얻었다(Table 1).

항산화 활성

DPPH의 자유라디칼은 생체 고분자인 지질, 단백질 등과 결합하여 노화 및 질병을 유발하는 물질로 밝혀진 이래 항산화 물질의 자유라디칼 소거능력 측정에 이용되고 있다[17]. 따

Table 1. Yield of various organic solvent fractions obtained from the total MeOH extract^a of *L. japonica*

Solvent fractions	Dried weight (g)	Yield (%) ^b
<i>n</i> -hexane	0.768	0.38
CHCl ₃	0.500	0.25
EtOAc	0.372	0.19
<i>n</i> -BuOH	2.172	1.09
H ₂ O	16.758	8.38

^aMeOH extract (19.61 g) obtained from 200 g of *L. japonica*.

$$^b\text{yield (\%)} = \frac{\text{Dried weight of solvent fractions (g)}}{\text{Dried weight of } L. japonica \text{ (g)}} \times 100$$

라서 본 실험에서는 DPPH 자유라디칼 소거활성법을 이용하여 금은화 추출물의 분획이 직접 자유라디칼을 제거하는 항산화 활성을 측정하여 양성 대조구인 BHA와 비교하였다. 금은화 추출 분획과 BHA를 각각 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml 농도로 제조하여 0.2 mM의 DPPH를 넣어 반응 후 감소하는 흡광도를 측정하여 얻은 자유라디칼 소거능을 살펴 본 결과를 Table 2에 나타내었다. 금은화 추출 각 분획의 농도가 증가할수록 흡광도가 감소하여 DPPH의 자유라디칼 소거활성이 유의성있게 증가하는 경향을 보이므로 농도 의존적으로 항산화 효과를 나타내었다($p < 0.01$). 100 µg/ml 농도의 BHA와 동량의 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획의 비교에서는 0.237과 0.257의 낮은 흡광도를 나타내어 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획은 BHA와 유사한 소거활성과 다른 분획 보다 상대적으로 높은 항산화 활성물질을 포함하고 있음을 알 수 있다($p < 0.05$). 또한 전자공여능(EDA)에 의해 얻은 ED₅₀은 BHA의 16.18 µg/ml 보다는 낮으나 에틸 아세테이트 분획에서 39.56 µg/ml로 가장 높았으며, 다음으로 부탄올 분획에서 160.76 µg/ml의 값을 보였다(Fig. 2). Shin과 Yoo [19]의 금은화 열수 및 에탄올 추출물에 대한 DPPH 자유라디칼 소거능은 에탄올 추출물에서 다소 높게 나타났음을 제시하였고, 본 실험에서는 금은화의 메탄올 추출에 의한 에틸 아세테이트 분획에서 항산화 활성물질이 다량 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 금은화에 함유된 항산화 활성물질은 특정 용매에만 용해되지 않고 다른 용매에도 용해되는 성

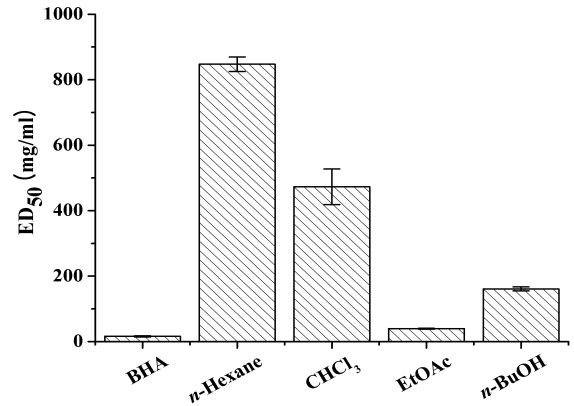


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity in various solvents fraction from *L. japonica* extract. ED₅₀ values were defined as the sample concentrations required for 50% the radical to be scavenged.

분으로 복합적인 특성을 가지며, 또한 추출 조건에 따라 항산화 활성물질의 함량 변화가 있는 것으로 생각된다.

금은화 추출 분획 및 H₂O₂의 세포독성 평가

금은화의 메탄올 추출에 의한 극성별 분획의 Raw 264.7 세포 생존율은 대조군을 100% (±2.96)으로 설정하여 1, 10, 100 및 1,000 µg/ml의 농도로 처리한 결과, 모든 처리군에서 93~98%의 세포 생존율로 농도에 따른 세포 생존율에는 큰 차이가 없는 것으로 보아 독성은 나타내지 않았으며, 세포의 성장에도 어떠한 영향을 미치지 않았다(Fig. 3A). 이는 Yun과 Lee [23]가 금은화의 열수 추출물과 에탄올 추출물 625 µg/ml까지의 농도에서 Raw 264.7 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았던 연구 결과와 일치한다. 또한 Chung 등[4]이 금은화의 열수 추출물 100 µg/ml까지의 농도에서 A549 (human type II-like epithelial cells) 세포에 대한 세포 생존율 10% 이내의 오차로 큰 영향을 미치지 않았던 것과, Lee와 Jang [11]이 인간 유래 U937 대식세포에 대한 10~500 µg/ml의 금은화 추출물에서도 세포독성이 없음을 확인한 바 있듯이, 여러 보고에서 건강조직과 세포에 대한 독성은 없는 것으로 알려졌다. 한편 ROS의 세포독성을 조사하기 위하여 Borenfreund와 Puerner

Table 2. Absorbance change by DPPH radical scavenging activity of each fraction of of *L. japonica*

Samples Conc. (µg/ml)	Control		Fractions			
	BHT	<i>n</i> -Hexane	CHCl ₃	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	
100	0.237±0.027 ^{ab}	1.527±0.008 ^a	1.443±0.017 ^a	0.257±0.017 ^{ab}	1.130±0.025 ^a	
75	0.363±0.025 ^a	1.545±0.005 ^a	1.497±0.003 ^a	0.304±0.007 ^a	1.273±0.011 ^a	
50	0.565±0.016 ^a	1.579±0.003 ^a	1.506±0.004 ^a	0.691±0.017 ^a	1.402±0.011 ^a	
25	0.785±0.021 ^a	1.593±0.005 ^a	1.579±0.008 ^a	1.051±0.021 ^a	1.511±0.005 ^a	

Blank: 1.659.

Values are mean±SD, n=3.

^asignificantly different ($p < 0.01$) by ANOVA test.

^bsignificantly different ($p < 0.05$) between control group by Tukey's test.

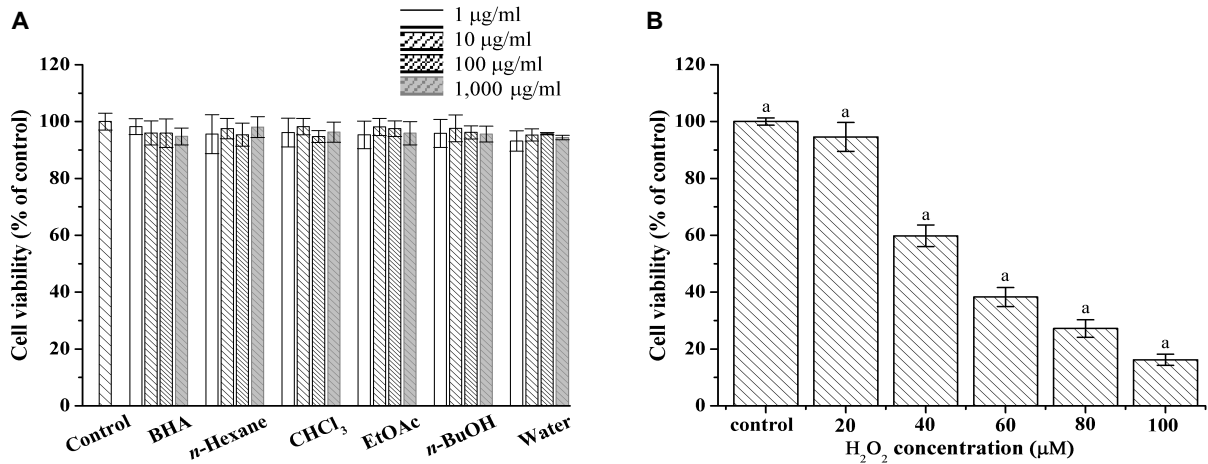


Fig. 3. Concentration-dependent effects of fractions from *L. japonica* extract (A) or H_2O_2 (B) on Raw 264.7 cell growth. Cells were treated with different concentration of each fraction or H_2O_2 as indicated in material and methods. Cell viability was analyzed using the MTT assay. The date indicated the mean \pm SD for triplicate experiments. ^asignificantly different ($p < 0.01$) by ANOVA test.

[2]의 독성관정 기준에 의하여 강독성인 것으로 나타난 H_2O_2 를 농도별로 Raw 264.7 세포에 처리하여 MTT assay로 분석한 결과, 농도 의존적인 세포독성을 나타내었으며($p < 0.01$) 특히, 50%의 세포사멸을 보이는 산화 스트레스의 조건(IC₅₀)은 50 μ M에서 나타났다(Fig. 3B).

H_2O_2 의 세포독성에 대한 금은화 추출 분획의 세포 생존율 분석

ROS의 Raw 264.7 세포독성에 대한 DPPH 소거능이 우수한 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획의 영향을 세포 생존율 측면에서 조사하였다. 선행실험(Fig. 3B)의 IC₅₀ 값인 50 μ M H_2O_2 로 배양 세포를 처리하기 1 시간 전에 농도별 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획이 포함된 배양액에서 처리한 후 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 4). H_2O_2 처리군의 세포 생존율은 대조군인 100% (± 2.96)에 비하여 38.71% (± 0.75)로 나타났다. 반면 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획 및 동일 농도별 BHA를 각각 Raw 264.7 세포에 처리하였을 때 세포 생존율은 농도 의존적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났으며($p < 0.01$), 10, 25, 50, 100 μ g/ml의 에틸 아세테이트 분획에서 각각 38.97 (± 0.62), 47.20 (± 0.62), 58.25 (± 3.12), 82.49% (± 3.33)의 세포 보호효과를 나타내었다.

세포 보호효과 관련 유전체 발현 분석

금은화의 주요 생리활성인 염증반응 억제와 독소의 중화반응 등은 금은화의 항산화 물질에 기인하며[19], 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획이 Raw 264.7 세포에서 H_2O_2 에 의한 ROS의 세포보호 효과가 있으므로, 항산화와 염증 관련 유전체 발현 양상을 조사 분석하였다. IC₅₀ (50 μ M)의 H_2O_2 독성에 대한 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획의 Raw 264.7 세포보호 효과에 관련된 유전체 발현의 패턴은 합성 항산화제인

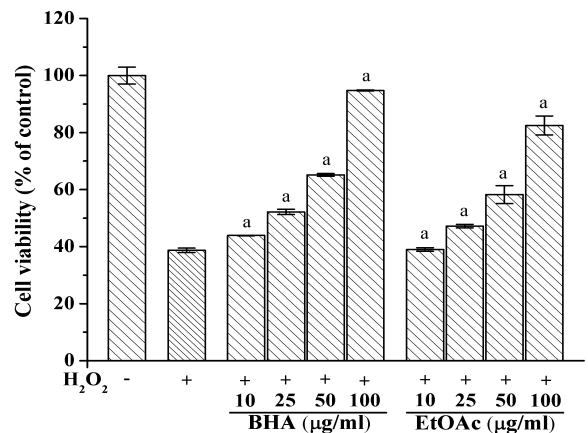


Fig. 4. Effects of the EtOAc fraction from *L. japonica* extract on H_2O_2 -induced Raw 264.7 cell death. Cells were treated with various concentration of EtOAc fraction and 50 μ M H_2O_2 as described in material and methods. Viable cells were analyzed using the MTT assay. Each value represent the mean \pm SD. ^aSignificantly different ($p < 0.01$) by ANOVA test.

BHA와 유사하게 나타났으나(Fig. 5A), 발현 차이는 BHA가 처리된 세포에서 더 높게 나타났다(Fig. 5B). 항산화 효과 관련 유전자들 NCBI 및 GenCards 데이터베이스에서 추출하고, 에틸 아세테이트 분획 및 BHA의 처리에서 영향을 받은 유전자(2-fold changed genes)로부터 재 추출 하였다(Fig. 6A). 31 개 유전자는 2 배 이상 발현 차이가 있으면서 항산화 효과에 관여하는 유전자 군이다. 이들 유전자들은 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획과 BHA 처리에서 유사한 발현을 보였다(Fig. 6B). 그러나 세포 내 주요 항산화 효소를 만드는 유전자 중 하나인 heme oxygenase 1 (Hmox1) 유전자의 발현 정도는 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획과 BHA 간에 상이했으며, 특히 금

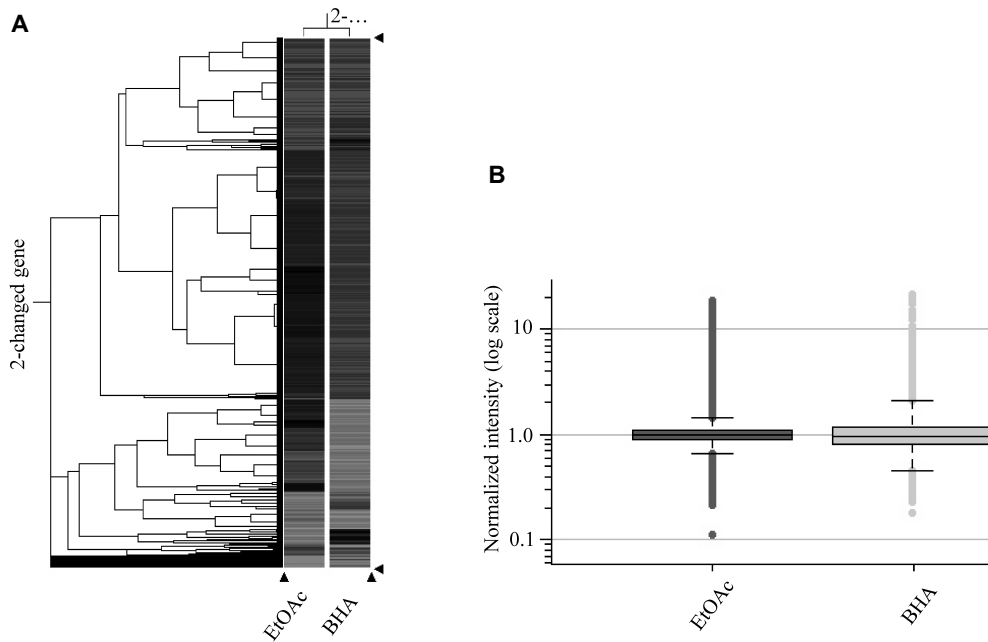


Fig. 5. Gene expression profiles by EtOAc fraction or BHA in H₂O₂-induced Raw 264.7 cells. The dendrogram showing the hierarchical clustering results in 2-fold altered genes between EtOAc fraction and BHA-treated Raw 264.7 cells (red, > twofold change; green, < twofold change) (A). A boxplot for each array showing the relative expression (B).

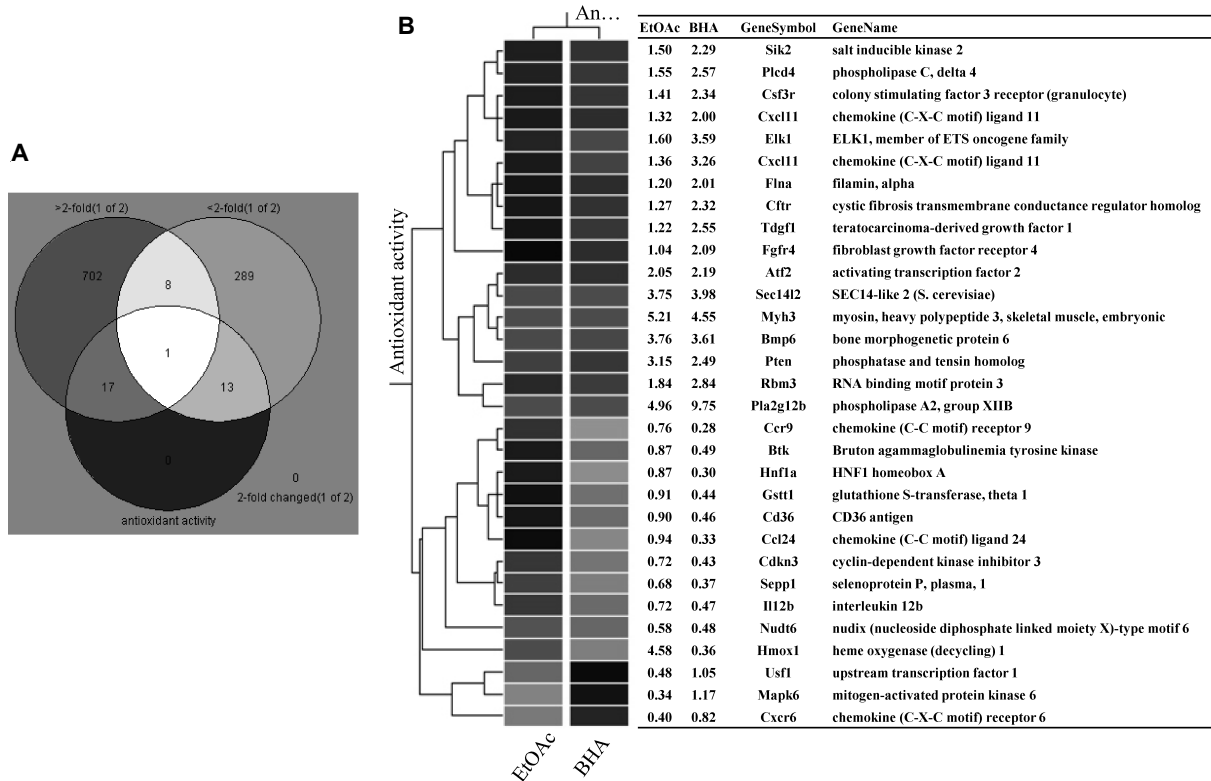


Fig. 6. Venn diagram and clustering results for antioxidant activity-related genes affected by EtOAc fraction or BHA in H₂O₂-induced Raw 264.7 cells (A). The 31 antioxidant activity-related genes changed more than twofold in at least one sample are presented by hierarchical clustering. Gene expression results for 31 antioxidant activity-related genes affected by EtOAc fraction or BHA in H₂O₂-induced Raw 264.7 cells (B). The dendrogram showing the hierarchical clustering result in twofold changed genes and signaling genes in antioxidant activity. EtOAc, normalized ratio for EtOAc fraction (EtOAc-H₂O₂/H₂O₂ ratio) and BHA, normalized ratio for BHA (BHA-H₂O₂/H₂O₂ ratio).

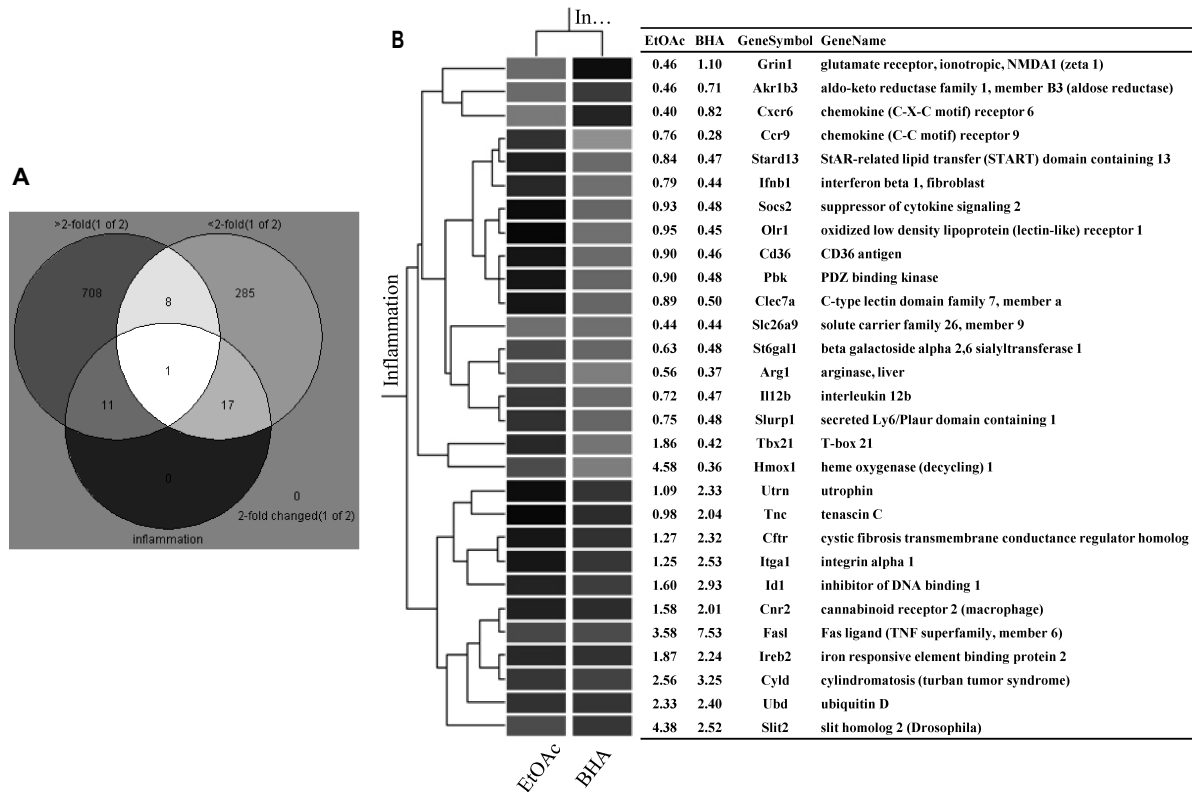


Fig. 7. Venn diagram and clustering results for inflammation-related genes affected by EtOAc fraction or BHA in H₂O₂-induced Raw 264.7 cells (A). The 29 inflammation-related genes changed more than twofold in at least one sample are presented by hierarchical clustering. Gene expression results for 29 inflammation-related genes affected by EtOAc fraction or BHA in H₂O₂-induced Raw 264.7 cells (B). The dendrogram showing the hierarchical clustering result in twofold changed genes and signaling genes in inflammation. EtOAc, normalized ratio for EtOAc fraction (EtOAc-H₂O₂/H₂O₂ ratio) and BHA, normalized ratio for BHA (BHA-H₂O₂/H₂O₂ ratio).

은화 추출 에틸 아세테이트 분획 처리군에서 4배 이상 증가한 것으로 나타났다. 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획의 항염증 반응에 대한 작용점 확인을 염증 관련 유전자와 비교 분석하였다(Fig. 7A). 29개 유전자가 에틸 아세테이트 분획 및 BHA 처리에 의해 영향을 받은 것으로 확인되었으며, 항산화 효과 관련 유전자 비교분석 결과와 같이 에틸 아세테이트 분획과 BHA 처리에서 매우 유사한 발현 양상을 보였다. 그러나 T-box transcription factor (Tbx21)의 발현 양상은 상이하였다(Fig. 7B). BHA 처리군에서는 2배 감소하였으나 에틸 아세테이트 분획의 처리군에서는 오히려 약 2배 증가하였다. 이는 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획에 의해 Tbx21 유전자가 발현되어 항염증 반응에 관여함을 알 수 있다. 전사인자 Tbx21은 T-box 계열의 Th1 특이성 전사인자로 IFN- γ 를 생성하는 Th1 세포에만 발현되어 있고 Th2 세포에는 존재하지 않는다. Tbx21 유전자는 T 세포에서 IFN- γ 의 생성을 유도하고, IL-4와 IL-5의 생성을 억제하여 naïve T 세포가 Th1 세포로 분화하도록 하여 Th1 세포 반응을 더욱 증진시키는 것으로 알려져 있다 [20].

항산화 효소를 합성하는 Hmox1 유전자는 산화적 스트레스

에 반응하여 항염증 작용에 관여하는 유전자이기도 하다[16]. 따라서 H₂O₂에 의해 유도된 ROS의 활성을 Hmox1에 의해 억제시킬 가능성이 있으므로, 산화적 스트레스 및 염증반응에 대한 구체적인 직접적인 분자기전을 규명하기 위해서는 추가적인 연구수행이 요구된다. 본 연구에서는 금은화 추출 에틸 아세테이트 분획에 의한 항산화 및 항염증 반응의 작용점에 있는 후보 유전자로 Hmox1과 Tbx21을 선정할 수 있었으며, 향후 금은화의 추출물로부터 항산화 활성 및 항염증 반응에 의한 세포보호 효과에 관련된 단일물질의 분리, 정제 및 이의 생리활성 평가에서 Hmox1과 Tbx21 유전자를 바이오마커(bio-marker)로 활용하고자 한다.

References

1. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
2. Borenfreund, E. and Puerner, J. A. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Methods* **9**, 7-9.
3. Chun, H. J., Hwang, S. G., Lee, S. J., Baek, S. H., Jeon, B.

- H. and Woo, W. H. 2002. Inhibitory effects of butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanogenesis in melan-a cells. *Korean J Pharmacogn* **33**, 130-136.
4. Chung, K. J., Jung, H. J., Jung, S. K. and Rhee, H. K. 2005. Lonicerae Flos contributes to the chemotaxis of eosinophils and secretion of cytokines in A549 human epithelial cells. *Korean J Orient Int Med* **26**, 129-142.
 5. Davies, K. F. and Goldberg, A. L. 1987. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem* **262**, 8227-8261.
 6. Fubini, B. 1998. Surface chemistry and quartz hazard. *Ann Occup Hyg* **42**, 521-530.
 7. Gordon, M. H. 1996. Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat Prod Rep* **13**, 265-273.
 8. Kim, I. L., Kim, H. C., Kook, Y. B., Park, S. J., Park, Y. G., Park, G. H., Seo, B. I., Seo, Y. B., Song, H. J., Shin, M. K., Lee, Y. J., Lee, Y. C., Lee, J. H., Lim, G. H., Cho, S. I., Jeong, J. K., Zoo, Y. S. and Choi, H. Y. 2007. Herbal medicine. pp. 240-242, Young lim publishing Co., Seoul, Korea.
 9. Kim, Y., Yang, S. Y., Oh, Y. S., Lee, J. W., Lee, Y. K. and Park, Y. C. 2010. Research trends of *Lonicera japonica* over the last 10 year. *J Daejeon Orient Med* **19**, 17-23.
 10. Kumaran, A. and Karunakaran, R. J. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem* **97**, 109-114.
 11. Lee, Y. S. and Jang, S. I. 2010. Study on the anti-inflammatory effects of remedy prescribed with Lonicerae Flos and scutellariae radix in U937 cells. *Korean J Orient Med Prescrip* **18**, 121-132.
 12. 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.
 13. Lrson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969-978.
 14. Maeura, Y., Weisburger, J. H. and Williams, G. 1984. Dose-dependent reduction of N-2-fluorenylacamide-induced liver cancer and enhancement of bladder cancer in rats by butylated hydroxytoluene. *Cancer Res* **44**, 1604-1610.
 15. 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.
 16. Piantadosi, C. A., Withers, C. M., Bartz, R. R., MacGarvey, N. C., Fu, P., Sweeney, T. E., Welty-Wolf, K. E. and Suliman, H. B. 2011. Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem* **286**, 16374-16385.
 17. Pitchumoni, S. S. and Doraiswamy, P. M. 1998. Current status of antioxidant therapy for alzheimers disease. *J Am Geriatr Soc* **46**, 1566-1572.
 18. Rehman, Z., Habbib, F. and Shah, W. H. 2004. Utilization of potatopeels extract as a natural anti-oxidant in bean oil. *Food Chem* **85**, 215-220.
 19. Shin, J. H. and Yoo, S. K. 2012. Antioxidant properties in microbial fermentation products of *Lonicera japonica* Thunb. *Extract J East Asian Soc Dietary Life* **22**, 95-102.
 20. Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G. and Glimcher, L. H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, direct Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669.
 21. 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.
 22. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1-40.
 23. Yun, K. J. and Lee, E. Y. 2012. Effects of hot aqueous and ethanol extract from *Lonicera japonica* Flos on NO and PGE2 in macrophage. *J Korean Acupunct Moxa Soc* **29**, 67-74.

초록 : 금은화 추출물의 항산화 효과를 통한 세포 보호효과 및 유전자 발현 양상조원준¹ · 윤희승¹ · 김용현² · 김정민³ · 유일재⁴ · 한만덕² · 방인석^{1*}¹호서대학교 생명과학과, ²순천향대학교 생명과학과, ³㈜엔에이알센터 DNA칩 분석팀, ⁴호서대학교 나노제품안전성연구센터)

금은화의 메탄올 추출에 의한 유기 용매별 분획에서 항산화 효과를 근거로 에틸 아세테이트 분획에서 H₂O₂로 유도된 RAW 264.7 세포독성에 대한 세포보호 효과와 유전자 발현 양상을 분석하였다. 용매별 분획의 항산화 활성은 시료의 농도가 증가할수록 DPPH에 대한 전자공여능도 증가하였으며, ED₅₀은 에틸 아세테이트 분획에서 39.56 µg/ml로 가장 높게 나타났다. 또한 H₂O₂에 의해 유도된 Raw 264.7 세포사멸(IC₅₀)에 대하여 에틸 아세테이트 분획은 농도 의존적으로 유의적인 세포 생존율과, 100 µg/ml의 농도에서 82.49%의 세포보호 효과를 나타내었다. 한편 IC₅₀의 H₂O₂ 독성에 대한 에틸 아세테이트 분획의 Raw 264.7 세포보호 효과에 관련된 유전자 발현의 패턴은 BHA와 유사한 것으로 나타났다. 항산화 관련 유전자군의 비교 분석에서는 에틸 아세테이트 분획과 BHA는 매우 유사한 유전자 발현 양상을 보였으나, 세포 내 주요 항산화 효소를 만드는 유전자 중 하나인 heme oxygenase 1 (Hmox1) 유전자의 발현 정도가 에틸 아세테이트 분획에서 4 배 이상 증가하였다. 항염증 관련 유전자군의 비교에서는 T-box transcription factor (Tbx21)가 BHA 처리군에서는 2 배 감소하였으나 에틸 아세테이트 분획의 처리군에서는 오히려 약 2 배 증가한 것으로 나타났다.