

tert-Butyl Hydroperoxide로 산화 스트레스가 유도된 HepG2 세포에서 말채나무 열수추출물의 항산화 활성

연성호 · 함현미 · 성지혜 · 김영화 · 남궁슬기 · 정현상 · 이준수[†]

충북대학교 식품공학과

Antioxidant Activities of Hot Water Extract from *Cornus walteri* Wanger against Oxidative Stress Induced by *tert*-Butyl Hydroperoxide in HepG2 Cells

Seong Ho Yeon, Hyeonmi Ham, Jeehye Sung, Younghwa Kim, Seulgi Namkoong, Heon-Sang Jeong, and Junsoo Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

ABSTRACT The objective of this study was to investigate the effect of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger (CWE) on *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP)-induced oxidative stress in HepG2 cells. Generation of reactive oxygen species (ROS), concentrations of cellular lipid peroxidation products and reduced glutathione, and antioxidant enzyme activity were used as biomarkers of cellular oxidative status. Cells pretreated with CWE (25~200 µg/mL) showed an increased resistance to oxidative stress in a dose-dependent manner, as revealed by a higher percentage of surviving cells compared to control cells. ROS generation induced by TBHP was significantly reduced when cells were pretreated with 200 µg/mL CWE for 4 h. Pretreatment with CWE (5~50 µg/mL) prevented the decrease in reduced glutathione and the increase in malondialdehyde and ROS evoked by TBHP in HepG2 cells. Finally, CWE pretreatments prevented the significant increase of glutathione peroxidase, catalase, glutathione reductase, and superoxide dismutase activities induced by TBHP. These results show that CWE has significant protective ability against a TBHP-induced oxidative insult and that the modulation of antioxidant enzymes by CWE may have an important antioxidant effect on TBHP-induced oxidative stress in HepG2 cells.

Key words: antioxidants, HepG2 cell, *tert*-butyl hydroperoxide, *Cornus walteri* Wanger, oxidative stress

서 론

인간을 비롯한 산소를 이용하는 모든 생명체들은 공기 중의 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지를 발생하는 과정에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 발생한다(1). 활성산소는 광범위한 생체 현상에 관여하여 직접 또는 간접적으로 생체의 장애를 일으키는 것으로 알려져 있으며 유해산소로 알려져 있는 활성산소인 superoxide radical(O₂⁻·), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(·OH), singlet oxygen(¹O₂) 등은 가장 안정한 형태인 삼중항 산소(triplet oxygen, ³O₂)가 환원되면서 생성되어진다. 이러한 활성산소는 반응성이 매우 강하여 주위의 화합물과 쉽게 반응하여 높은 반응성을 갖는다(2,3). 이렇게 발생된 활성산소는 자기방어기구인 생체 내 제거 기작에 의해 대부분 몸속에서 저절로 없어지거나 각종 감염을 막는 면역기능도 하지만, 생체 방어기구에 이상이 초래되거나 각종

물리적·화학적 요인에 의해 세포 내 항상성이 깨지면서 활성산소의 생성이 증가하여 산화 스트레스를 초래한다. 이러한 산화 스트레스가 지속되면 DNA를 손상시켜 암을 유발하고, 세포 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜 체내 과산화지질을 축적함으로써 피부노화를 비롯한 동맥경화, 뇌졸중, 당뇨병, 종양의 생성과 같은 여러 가지 질병을 야기한다고 알려져 있다(4-7).

말채나무(*Cornus walteri* Wanger)는 우리나라 전국 각지의 습기가 비교적 많은 계곡 주변이나 궁궐, 왕릉에서 많이 볼 수 있는 나무로 층층나무과(*Cornaceae*), 층층나무속(*Cornus*)에 속하는 교목성 낙엽활엽수이다(8). 한방에서는 말채나무의 가지와 잎을 모래지엽(毛楝枝葉)이라 하여 설사를 멈추거나 옷독을 치료하는데 사용하고 있으며, 민간에서는 말채나무를 달여 먹으면 살이 빠진다고 하여 '신선목' 또는 '빼빼목'이라는 이름으로 사용되어 왔다. 최근 말채나무에 관한 연구로는 Choi 등(9)이 말채나무껍질에서 gallic acid, (+)-gallocatechin, (+)-catechin, quercetin, quercitrin, rutin, isoquercitrin, hyperoside와 같은 8종의 phenol성 화합물을 분리 및 동정하였으며, 그중 gallic acid와

Received 17 June 2013; Accepted 29 July 2013

[†]Corresponding author.

E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr, Phone: 82-43-261-2566

(+)-gallic acid의 함량이 0.054%, 0.022%인 것으로 보고하였고, Lim 등(10)은 말채나무 에탄올 추출물을 마우스에 투여한 결과 α -amylase의 활성이 저해되어 식후 혈당 상승이 유의하게 억제되었으며, 유의적이지는 않았지만 체중이 감소하는 경향이 있었다고 보고하였다. 또한 Park과 Cha(11)는 고지방식이를 8주간 투여한 후 비만으로 유도된 동물에게 모래지엽 추출물을 4주간 투여한 결과 모래지엽 처리군이 대조군에 비해 지질강화효과를 보였으며, 간장 내 항산화효소 및 항염증활성에 효과를 나타내어 비만으로 인한 고지질 및 이와 관련된 대사성질환에 효능이 있을 것으로 보고했다. 그러나 말채나무 추출물에 대한 항산화 물질의 함량 및 항산화력에 관한 연구는 없는 실정이다. 본 연구에서는 다량의 phenol 화합물을 함유하고 있는 말채나무에 강력한 항산화 활성이 있을 것으로 판단하여 말채나무를 열수 추출한 후 동결건조한 것을 시료로 하여 항산화 활성에 대해 연구하였다. 즉 HepG2 세포에 *tert*-butyl hydroperoxide(TBHP)로 산화 스트레스를 가했을 때 세포 생존율 및 세포독성 보호 효과와 ROS 생성 억제효과, 지질과산화물의 측정지표인 malondialdehyde(MDA)의 농도, 그리고 세포 내 항산화 방어시스템의 주요 효소들의 활성 및 체내 비효소적 항산화물질인 glutathione의 생성에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 말채나무는 강원도 영월지역에서 자생하는 것으로 2011년 4월 승매가(Yeongwol, Korea)로부터 구입하였으며 구입한 시료는 이물질이 제거되도록 세척한 후 건조하여 사용하였다.

추출물 제조

환류 냉각관을 부착한 3 L 플라스크에 세절한 말채나무 가지 300 g을 넣은 후 2 L 가량의 물을 넣고 100°C의 수욕상(Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 5시간 추출하였다. 추출물은 Whatman No. 5(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 감압 여과한 다음, 회전진공 농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co.)로 농축한 후 동결건조(freeze dryer, FD5508, Ilshin Lab Co., Dongducheon, Korea) 하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였고 최종 추출수율은 5.4%로 나타났다.

기기 및 시약

본 실험에 사용된 시약인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA), thiobarbituric acid(TBA), *tert*-butyl hydroperoxide(TBHP), trichloroacetic, reduced glutathione(GSH), oxidized glutathione, β -NADPH, glutathione reductase(GR), peroxidase, 1-chloro-2,4-dini-

trobenzene(CDNB), hydrogen peroxide(H₂O₂), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB), ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA), xanthine, xanthine oxidase, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazolium bromide(MTT), 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS)와 표준물질인 gallic acid, (+)-catechin hydrate는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, 4-(3-(4-diophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate sodium salt (WST-1)는 Roche(Mannheim, Germany)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 HepG2 세포는 Korean collection for type culture (Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

항산화 성분 측정

말채나무 열수추출물의 페놀성 화합물의 함량은 Folin-Ciocalteu phenol(FC) reagent가 추출물의 phenolic compounds에 의해 환원된 결과 몰리브덴을 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다(12). 즉 추출물 100 μ L에 2% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 가한 후 3분간 방치하여 50% FC reagent 100 μ L를 가하고 30분 후, 반응액의 흡광도 값을 spectrophotometer(UV-1650, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 750 nm에서 측정하였다. 표준물질인 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 총 폴리페놀 함량은 시료 100 g 중의 mg gallic acid로 표시하였다. 말채나무 열수추출물의 총 플라보노이드 함량은 추출물 250 μ L에 증류수 1 mL와 5% NaNO₂ 75 μ L를 가한 다음, 5분 후 10% AlCl₃ 6H₂O 150 μ L를 가하여 6분 방치하고 1 N NaOH 500 μ L를 가하고 11분 후, 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다(13). 표준물질인 (+)-catechin hydrate를 사용하여 검량선을 작성한 후, 총 플라보노이드 함량은 시료 100 g 중의 mg (+)-catechin hydrate로 표시하였다.

항산화 활성 측정

말채나무 열수추출물의 *in vitro* 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 및 환원력을 측정하였다. 즉 DPPH 라디칼을 0.2 mM이 되도록 94% 에탄올에 용해시킨 반응액 800 μ L에 추출물 200 μ L를 첨가한 후, 520 nm에서 정확히 30분 후에 흡광도 감소치를 측정하였다(14). 말채나무 열수추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이 반응액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.4~1.5가 되도록 물 흡광계수($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 추출액 50 μ L를 가하여 60분 후에

흡광도의 변화를 측정하였다(15). 말채나무 열수추출물의 환원력은 추출물 250 μL 에 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 250 μL , 1% potassium ferricyanide($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 250 μL 를 각각 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후 1% trichloroacetic acid(CCl_3COOH , w/v)를 가하였다. 위 반응액을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액 500 μL 에 증류수 500 μL 를 혼합하고, 0.1% ferric chloride($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 100 μL 를 가하여 반응액의 흡광도 값을 700 nm에서 측정하였다(16).

세포배양

HepG2 세포는 75 cm^2 culture dish에서 10% FBS, 100 unit/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 5% CO_2 가 공급되는 incubator (Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 37°C로 배양하였다.

세포 생존율 측정 및 TBHP에 의한 시료의 보호효과

HepG2 세포는 96-well plate에 1×10^4 농도로 각 well에 분주하였다. 24시간 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 세척 후 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 말채나무 열수추출물 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 각 well에 처리 하였다. 4시간 후 세포는 200 μM TBHP로 4시간 동안 산화 스트레스를 유도한 후 말채나무 시료의 보호효과는 MTT 방법으로 micro plate reader(BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도의 측정에 의해 절대 세포 생존율을 수량화 하였으며 3회 반복 실험하였다.

ROS 생성 억제효과

ROS는 fluorescent probe DCFH-DA 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 세포를 96-well plate에 5×10^4 의 농도로 각 well에 분주하고 말채나무 열수추출물을 다양한 농도(25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 전 처리하였다. 4시간 후, 250 μM DCFH-DA를 37°C에서 1시간 동안 각 well에 첨가하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 1 mM TBHP를 첨가하였다. 세포간에 상응하는 ROS는 fluorescent spectrophotometer(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)로 100분 동안 여기과장(excitation wavelength) 485 nm와 방출과장(emission wavelength)을 530 nm에서 fluorescent intensity를 측정하였다.

지질과산화 측정

MDA 측정은 thiobarbituric acid (TBA) 방법(17)으로 측정하였다. 즉, 상등액 0.4 mL에 TBA solution(TBA 0.375%, trichloroacetic acid 15%, HCl 0.25 N) 0.4 mL를 첨가한 후 15분간 수욕상에서 가열하였다. 10,000 $\times g$ 에서 5분간 원심분리한 후 535 nm에서 상등액의 흡광도를 측정

하였다. 시료의 MDA 농도는 $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 의 흡광계수를 사용하여 측정하였고 그 결과는 단백질 mg당 MDA의 nmol로 표현하였다.

GSH 함량 및 항산화 효소 활성

HepG2 세포는 6-well plate에 1×10^6 농도로 각 well에 분주하였다. 48시간 후 배지는 다양한 농도(5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 말채나무 물 추출물을 처리하였다. 4시간 배양 후 1 mM TBHP로 3시간 동안 산화 스트레스를 유도하였다. 처리 후 세포는 rubber policeman으로 취하여 얼음에 보관하였다. 세포는 Vibra-Cell VCX 750 sonicator(Sonic & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)를 사용하여 10초간 용해하였으며, 용해물은 4°C에서 10분간 10,000 $\times g$ 로 원심분리하고 상등액은 즉시 GSH 및 항산화 효소 활성 분석에 사용하였다. 세포 내의 총 GSH는 Baker 등(18)의 변형된 방법에 따라 측정하였다. 세포 용해물에는 단백질을 침전시키기 위해 5% sulfosalicylic acid를 첨가한 후 4°C에서 10분간 10,000 $\times g$ 로 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 20 μL 에 3 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 400 units/mL glutathione reductase(GR) 그리고 2.5 mM NADPH가 포함된 반응 혼합물(180 μL)을 첨가하여 412 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 10분 동안 20초 간격으로 측정하였다. 세포 용해물에서 GSH의 농도는 표준곡선을 이용하여 계산하였고 단백질 mg당 GSH의 nmol로 표현하였다. GR의 활성은 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)를 사용하여 결정하였고, thiobenzoic acid 형성 때문에 412 nm에서 흡광도 증가를 측정하였다. Glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성은 GSH-Px에 의한 GSH의 산화에 근거하여 GR에 의한 NADPH의 소멸에 결합하는 기질로서 cummen hydroperoxide를 사용하였다(19). 세포 내 catalase(CAT) 활성은 Fossati 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였으며, superoxide dismutase(SOD)는 Ukeda 등(21)의 방법을 이용하여 측정하였다.

통계분석

실험의 결과 값은 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며 실험군간의 비교분석은 SAS version 8.1(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 one-way analysis of variance 분석 후 각 농도의 평균치의 통계적 유의성을 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

결과 및 고찰

항산화 성분 함량 및 항산화 활성

말채나무 열수추출물에 대한 항산화 성분으로서 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 함량을 측정하고, *in vitro* 항산화활성으로 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 환원력을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 페놀성 화합물 및 총 플라보노

Table 1. Phenolic compounds contents and antioxidant activities of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger (CWE)

Analysis items	Phenolics content (mg GAE/100 g) ¹⁾	Total flavonoid content (mg CE/100 g) ²⁾	DPPH (mg TEAC/100 g) ³⁾	ABTS (mg TEAC/100 g)	Reducing power (A ₇₀₀) ⁴⁾
Estimated values	1,455.82±52.49 ⁵⁾	948.49±13.51	853.41±22.31	238.41±81.50	0.70±0.00

¹⁾Mean of triplicate determination expressed as mg gallic acid equivalents per 100 g of CWE.

²⁾Mean of triplicate determination expressed as mg catechin equivalents per 100 g of CWE.

³⁾Mean of triplicate determination expressed as mg TEAC per 100 g of CWE.

⁴⁾Reducing power activity of water extracts expressed as optical density at 700 nm.

⁵⁾Values represent the mean±standard deviation of three replications.

이드 함량은 각각 1,455.82±52.49 mg GAE/100 g과 948.49±13.51 mg CE/100 g으로 나타났는데 일반적으로 항산화 성분의 함량이 높다고 알려진 녹차의 경우 Jeong 등(22)은 녹차에 함유된 페놀성 화합물과 총 플라보노이드의 함량을 각각 85.62 mg GAE/g과 242.74 mg/100 g으로 보고하였다. 또한 말채나무 열수추출물의 항산화활성을 측정하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)로 측정한 결과 각각 853.41±22.31 및 238.41±81.50 mg TEAC/100 g으로 나타났으며 항산화활성과 밀접한 관련이 있는 환원력에 대한 흡광도 값을 300 µg/mL의 농도에서 측정한 결과 0.70으로 나타났다. Ju 등(23)은 약용식물인 오가피를 열수로 추출하여 1.0 mg/mL의 농도에서 흡광도 값을 측정한 결과 0.71로 나타났다고 보고하였고 Joo(24)는 에탄올로 추출한 오가피와 헛개나무 추출물의 흡광도를 1.0 mg/mL의 농도에서 측정한 값을 각각 1.63, 1.1로 보고하였다.

세포생존율 및 세포독성 보호효과

말채나무 열수추출물이 HepG2 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 이용한 세포 생존율을 측정하였다. 말채나무 열수추출물의 농도를 각각 25, 50, 100 및 200 µg/mL로 처리한 후 세포 생존율을 측정한 결과 농도별로 처리한 구간 내 세포 생존율은 90.54~97.97%로 측정됨에 따라 200 µg/mL 농도까지는 세포독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1). 말채나무 열수추출물이 세포 생존율에

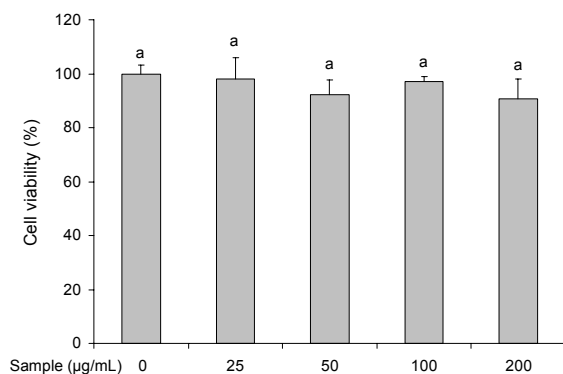


Fig. 1. Cytotoxicity of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger (CWE) in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of CWE (25~200 µg/mL) for 4 hours. Cell viability was determined by MTT assay.

영향을 미치지 않는 것이 확인됨에 따라 세포에 TBHP로 산화 스트레스를 유도했을 때 세포독성에 대한 추출물의 보호효과를 알아보았다. 세포에 말채나무 열수추출물을 농도별(25~200 µg/mL)로 전 처리한 후, TBHP 200 µM을 4시간 동안 세포에 노출시킨 결과 말채나무 열수추출물이 처리되지 않은 세포에서는 대조군인 정상세포에 비해 세포 생존율이 53.98%로 유의적인 감소를 보였다($P<0.05$, Fig. 2). 그러나 말채나무 열수추출물이 전 처리된 세포에서는 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가했으며, 특히 200 µg/mL에서는 95.50%의 세포 생존율을 보여 말채나무 열수추출물은 TBHP로 유도된 산화 스트레스에 대해 세포 보호효과가 있는 것으로 판단되었다.

ROS 생성 억제효과

ROS는 free radical 및 1O_2 , O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$ 등 다양한 형태의 활성화된 산소로, 생명체의 항상성 유지기작을 통해 조절된다(25). 하지만 노화 및 산화 스트레스로 조절능이 불안정화되면 ROS의 양이 많아져 세포막지질의 산화, 세포 단백질의 변성 및 DNA의 손상을 유발하게 되며, 결국 노화의 촉진 및 각종 성인병을 발병시켜 인간의 수명을 단축시키는 것으로 잘 알려져 있다(26). 그러므로 세포 내 ROS의 축적은 살아있는 세포에 산화적 손상의 좋은 지표이다. 세포

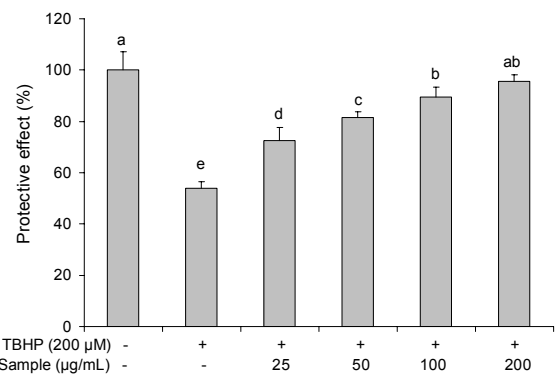


Fig. 2. Protective effect of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger (CWE) on *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP)-induced cytotoxicity. HepG2 cells were treated with different various concentration of CWE (25~200 µg/mL) for 4 hours and then exposed to TBHP (200 µM) for 4 hours. Cell viability was determined by MTT assay. ^{a-e}Different letters above the bars indicate a significant difference (analysis of variance and Duncan's multiple range test, $P<0.05$).

내에서 산화 스트레스에 의해 발생하는 ROS 생성에 대한 말채나무 열수추출물의 억제활성을 알아보기 위해 HepG2 세포에 TBHP로 산화 스트레스를 유도한 뒤 DCFH-DA probe를 이용하여 ROS의 양에 따른 형광발생 정도를 측정하였다. DCFH-DA는 비극성, 비이온성구조를 가짐으로써 세포막을 통과하여 확산할 수 있다. 세포막을 통과한 DCFH-DA는 세포질에서 세포 내 esterase에 의해 비형광물질인 DCFH로 가수분해된다. ROS 존재 시에 DCFH는 산화되어 형광을 띠는 DCF로 전환된다. 따라서 세포 내 ROS의 양이 많을수록 측정되는 형광값이 커지므로 추출물 내에 항산화 물질이 존재하는 경우 항산화물질에 의한 ROS 생성이 억제되어 DCF 형광도가 감소되는 것을 이용하여 측정한다(27,28). 실험결과 TBHP 1 mM을 4시간 동안 처리하여 산화 스트레스를 유발한 세포에서는 시간이 경과함에 따라 아무것도 처리하지 않은 정상세포에 비해 ROS의 생성이 빠르게 증가하였다(Fig. 3). 그러나 말채나무 열수추출물을 25, 50, 100 및 200 µg/mL의 농도로 전 처리한 세포에 TBHP를 처리한 결과 ROS는 농도에 따라 생성이 억제되는 효과를 보여주었다. 이는 HepG2 세포에 포도씨에서 분리한 toco-trienol-rich fraction(TRF)을 10~500 µg/mL의 농도로 전 처리한 후 TBHP로 산화 스트레스를 유도한 결과 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하였다고 보고한 Choi 등(29)의 연구와 유사한 경향이였다. 그러나 말채나무 열수추출물의 경우 200 µg/mL로 처리하였을 때 ROS의 생성은 정상세포보다 더 낮은 수치를 보여 말채나무 열수추출물은 산화 스트레스에 의한 ROS 생성 억제에 강한 활성이 있는 것으로 나타났다.

지질과산화 측정

지질과산화는 free radical에 의해 지질성분인 불포화지방산의 methylene(-CH₂-)기로부터 수소원자가 탈취됨에 따라 개시되는데, 이때 주로 관여하는 free radical은 hy-

droxy group이며 수소탈취에 의해 생긴 alkyl radical(R·)은 다시 산소와 결합하여 peroxy radical을 형성한다. Peroxy radical은 다시 다른 불포화지방산으로부터 수소를 탈취함으로써 일종의 chain reaction이 진행된다. 이때 연쇄 반응의 부산물로 MDA가 생성되며 MDA는 지질과산화물의 지표로 사용된다(30). 이와 같은 현상은 불포화지방산 구성성분이 많고 인지질함량이 풍부한 미토콘드리아, 마이크로솜, 적혈구, 혈소판 등의 막에서 쉽게 일어날 수 있다. 이렇게 생긴 과산화지질은 세포나 조직막을 손상시켜 노화현상 촉진, 동맥경화와 같은 질병을 유발하는 원인으로 작용한다. 말채나무 열수추출물의 지질과산화 억제활성을 알아보기 위해 HepG2 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상세포의 MDA 농도를 측정된 결과 1.66 nmol/mg protein이었다(Fig. 4). 그러나 TBHP 1 mM을 단독으로 4시간 동안 세포에 처리하였을 때 MDA 농도는 2.74 nmol/mg protein으로 정상세포에 비해 유의하게 증가하여 HepG2 세포가 TBHP에 의해 지질과산화가 진행됨을 알 수 있었다(*P*<0.05). 그러나 말채나무 열수추출물이 5, 10, 25 및 50 µg/mL의 농도로 전 처리된 세포에 TBHP 1 mM을 동일하게 처리한 결과 지질과산화 반응은 농도 의존적으로 억제되어 세포의 MDA 농도가 감소하는 경향을 보였다. 특히 추출물이 25, 50 µg/mL로 처리된 세포에서의 MDA 농도는 각각 2.25 nmol/mg protein 및 2.05 nmol/mg protein으로 TBHP로 산화 스트레스가 유도된 세포에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다(*P*<0.05). Kim 등(31)은 HepG2 세포에 TBHP를 처리하였을 때 유의적으로 증가한 MDA를 탈지된 포도씨에서 추출한 oligometric procyanidin fraction(OPF)과 polymeric procyanidin fraction(PPF)을 10~20 µg/mL의 농도로 전 처리하였을 때 모든 용량에서 감소하였다고 보고하였고 앞서 TRF의 ROS의 생성억제를 연구한 Choi 등(29)도 TRF가 50~100 µg/mL의 농도에서 지질과산화를 억제하였다고 보고하였다.

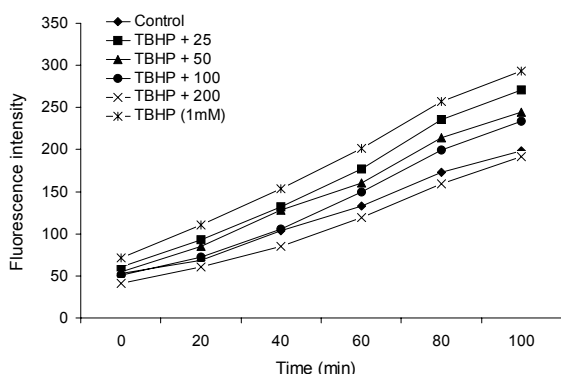


Fig. 3. Effect of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger (CWE) on the intracellular reactive oxygen species (ROS) formation induced by *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP). HepG2 cells were treated for 4 hours with the indicated concentrations of CWE before treatment with 1 mM TBHP. Intracellular ROS were measured by monitoring the fluorescence increase for 100 minutes.

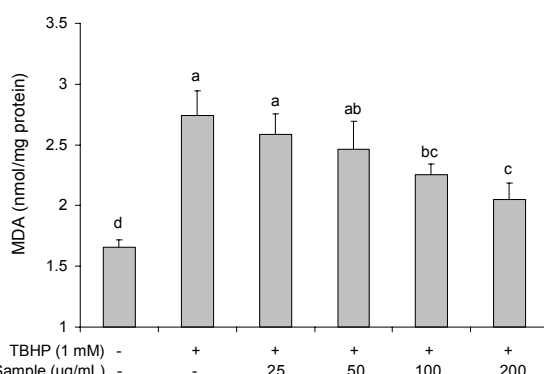


Fig. 4. Effect of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger (CWE) on *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP)-induced lipid peroxidation. HepG2 cells were treated for 4 hours with the indicated concentrations of CWE before treatment with 1 mM TBHP. ^{a-d}Different letters above the bars indicate a significant difference (analysis of variance and Duncan's multiple range test, *P*<0.05).

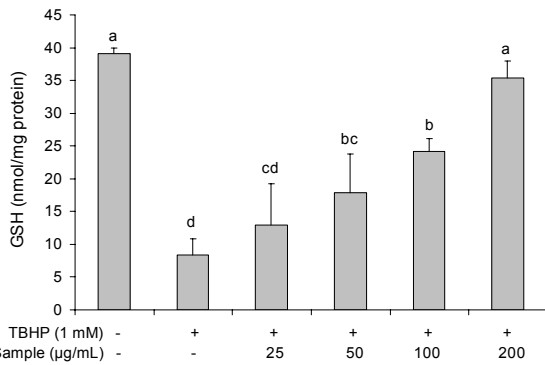


Fig. 5. Effect of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger (CWE) on *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP)-induced cellular redox state impairment. HepG2 cells were treated for 4 hours with the indicated concentrations of CWE before treatment with 1 mM TBHP. ^{a-d}Different letters above the bars indicate a significant difference (analysis of variance and Duncan's multiple range test, $P < 0.05$). GSH: reduced glutathione.

GSH 함량 측정

GSH는 glutamate, cysteine, glycine으로 결합된 트리펩타이드로서 환원형태(GSH)와 산화형태(GSSG)로 존재한다. GSH는 85~90% 정도가 cytoplasm에 존재하면서 생체 내의 산화, 환원반응에 중요한 역할을 한다. 항산화 성분으로서의 GSH의 중요성은 외부로부터의 산화 스트레스나 생체 내 free radical을 제거하는 능력을 보유하고 있으며 H_2O_2 와 지질과산화물 대사시키는 GSH-Px, GST에 전자공여체로 세포방어체계에 중요한 역할을 한다(32). 이는 GSH가 체내에서 산화 스트레스가 발생할 경우 항산화제의 조절자로 기능하는 물질임을 알 수 있는데 간세포에서 TBHP로 유도된 독성의 첫 번째 기작중의 하나가 GSH level의 감소이다(29). 따라서 말채나무 열수추출물의 세포보호효과를 포함한 항산화 기전을 더 명확히 하기 위해 세포 내 GSH의 변화를 측정하였으며 실험결과 HepG2 세포에 TBHP 1mM을 단독으로 처리하여 산화 스트레스를 유도한 세포에서 GSH의 농도는 8.32 nmol/mg protein으로 아무것도 처리하지 않은 정상세포의 39.11 nmol/mg protein에 비해 현저하게 감소하였다($P < 0.05$, Fig. 5). 이는 TBHP로 산화 스트레스를 유발시켰을 때 세포 내 GSH가 GSSG로 전환되면서

GSH의 농도가 감소한 것으로 보인다. 그러나 말채나무 열수추출물을 5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 전 처리한 세포에 TBHP를 4시간 동안 처리한 결과 GSH의 농도는 추출물의 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 특히 말채나무 열수추출물의 농도를 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 처리한 세포에서의 GSH 농도는 TBHP로 손상된 세포에 비해 유의적으로 증가하였으며($P < 0.05$), 추출물의 최고 처리농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 일 때 GSH의 농도는 정상세포와 거의 유사한 수준인 35.43 nmol/mg protein이었다. 이는 말채나무 열수추출물에 함유된 페놀성 화합물의 강력한 항산화 작용으로 인해 세포내 GSH가 GSSG로 전환되지 않았기 때문에 상대적으로 GSH의 농도가 증가한 것으로 보인다. Lima 등(33)은 HepG2 세포에 TBHP로 산화 스트레스를 유도했을 때 GSH의 농도가 정상세포에 비해 감소하였으나 약용식물로 알려진 세이지 추출물로 처리하였을 때 GSH의 농도가 증가한다고 보고하였으며 Jiao 등(34)도 녹차에 함유되어 있는 catechin으로 실험을 한 결과 TBHP에 의해 감소된 GSH의 농도가 증가한다고 보고하여 본 연구와 비슷한 경향을 나타냈다.

항산화 효소 활성

항산화효소들의 체내 방어기전은 소량의 Mn, Cu, Zn, Se과 결합하여 O_2 로부터 일차적인 radical의 형성과 증가를 억제한다(28). 항산화 효소인 SOD는 산화 스트레스에 의해 세포 내 과잉으로 생성되는 O_2^- 를 H_2O_2 와 산소로 변환시키고 CAT는 H_2O_2 를 산소와 물로 변환시키는 역할을 하며 GSH-Px는 지질과산화물을 분해시키는 작용을 한다. GR은 GSSH를 다시 환원시켜 GSH로 전환시키는 효소로서 GSH의 산화·환원 사이클(redox cycle)은 세포질 내 과산화물의 환원반응에 핵심적 기전이다. 따라서 이들 효소는 지질과산화의 개시단계에서 지질산화를 저해하는 효과를 가지므로 보고되었다(35). HepG2 세포에 TBHP로 산화 스트레스를 유도했을 때 이에 대응하는 항산화효소의 활성을 알아보자 CAT, GSH-Px, SOD, GR의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 2와 같다. 세포에 TBHP 1 mM을 4시간 동안 처리했을 경우 CAT, SOD, GSH-Px, GR의 활성은 아

Table 2. Effect of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger (CWE) on antioxidant enzyme in HepG2 cells

Treatment	CAT ¹⁾	SOD ²⁾	GR ³⁾	GSH-Px ⁴⁾
Control	35.88±2.82 ^{c5)}	52.97±6.97 ^b	1.10±0.08 ^d	5.84±0.67 ^d
TBHP only	55.20±2.06 ^a	103.86±15.71 ^a	2.79±0.16 ^a	22.80±1.32 ^a
TBHP+CWE 5	53.10±2.03 ^a	68.44±16.25 ^b	2.58±0.42 ^a	19.20±1.53 ^b
TBHP+CWE 10	46.16±1.87 ^b	67.46±11.83 ^b	2.17±0.02 ^b	18.66±2.56 ^b
TBHP+CWE 25	43.10±2.32 ^b	65.56±14.69 ^b	1.88±0.20 ^{bc}	16.56±1.44 ^b
TBHP+CWE 50	32.11±1.18 ^d	64.96±6.51 ^b	1.75±0.11 ^c	13.32±1.35 ^c

¹⁾Antioxidant enzyme activity of catalase (CAT) ($\mu\text{mol/minute/mg}$ of protein). ²⁾Superoxide dismutase (SOD) (units/minute/mg of protein). ³⁾Glutathione reductase (GR) (nmol/minute/mg of protein). ⁴⁾Glutathione peroxidase (GSH-Px) (nmol/minute/mg of protein) were evaluated in HepG2 cells treated with 1 mM *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) for 4 hours. Values represent the mean±standard deviation of three replications.

⁵⁾Values with the same letter in the same column are not significantly different ($P < 0.05$).

무 것도 처리하지 않은 정상세포에 비해 모두 유의적으로 증가($P<0.05$)하였는데 이는 산화 스트레스에 대한 세포 방어시스템의 반응으로 판단된다. 그러나 말채나무 열수추출물을 5, 10, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 전 처리한 세포에 TBHP로 산화 스트레스를 유도했을 경우 증가된 SOD, GSH-Px, CAT 및 GR의 활성이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였으며 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 모든 효소의 활성이 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 특히 GSH-Px의 활성은 최저 농도인 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적으로 감소하였다. Alia 등(36)은 HepG2 세포에 TBHP로 산화 스트레스를 유도했을 때 GSH-Px, CAT, SOD, GR과 같은 항산화 효소의 활성이 유의적으로 증가하였으나 양파와 같은 다양한 식이에 존재하는 flavonol 중 하나인 quercetin으로 처리하였을 때 항산화 효소의 활성이 감소하였다고 보고하였고, Kim 등(31)도 탈지된 포도씨의 OPF와 PPF의 항산화 효소 활성시험에서 TBHP로 산화 스트레스를 유도했을 경우 GSH-Px, CAT, SOD의 활성이 증가하였지만 PPF와 OPF를 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 감소하였다고 보고하였다. 위의 결과로 볼 때 앞에서 연구한 말채나무 열수추출물의 지질과산화 억제활성 및 GSH의 농도 증가는 GSH-Px 및 GR의 활성으로 인한 GSH의 산화·환원 사이클의 기전으로 사료된다. 이로써 말채나무는 HepG2 세포 내에서 질병과 노화의 원인물질인 활성산소에 대해 항산화활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

요 약

말채나무 열수추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해 HepG2 세포에 TBHP로 산화 스트레스를 유도한 뒤 말채나무 열수추출물의 세포 보호효과, ROS 생성억제, 지질과산화억제 및 GSH 생성에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. 말채나무 열수추출물은 HepG2 세포에 TBHP로 산화 스트레스를 유도한 뒤 나타나는 세포독성에 대해 농도 의존적으로 유의하게 세포 보호효과를 보였으며, ROS 생성과 과산화물에 대한 지표로서 측정된 MDA도 말채나무 열수추출물에 의해 효과적으로 억제되었다($P<0.05$). 또한 항산화 성분으로 생체 내에서 산화 및 환원반응에 중요한 역할을 하며 항산화 효소인 GSH-Px, GST에 전자공여체로 작용하는 GSH의 생성촉진 효능에서도 말채나무 열수추출물은 산화 스트레스로 감소된 GSH의 생성을 농도 의존적으로 촉진시켰다($P<0.05$). 산화 스트레스에 의해 활성이 증가된 항산화 효소(CAT, SOD, GSH-Px, GR)도 말채나무 열수추출물의 처리로 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과로 미루어 보아 말채나무 열수추출물은 인체 내에서 질병과 노화를 일으키는 원인 물질인 활성산소에 대해 강한 항산화 활성을 나타냄에 따라 보다 다양한 형태의 소재로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 연구비 지원(과제번호 2012R1A1A4A0105273)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547-581.
2. Gutteridge JMC, Halliwell B. 1994. *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Oxford University Press, Oxford, UK. p 143.
3. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165: 215-219.
4. Pellegrini M, Baldari CT. 2009. Apoptosis and oxidative stress-related diseases: the p66Shc connection. *Curr Mol Med* 9: 392-398.
5. Bayr H. 2005. Reactive oxygen species. *Crit Care Med* 33: 498-501.
6. Malle E, Marsche G, Arnhold J, Davies MJ. 2006. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta* 1761: 392-415.
7. Kamat JP. 2006. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. *Indian J Exp Biol* 44: 436-447.
8. Lee SH, Yoon KR, Lee E, Cha YY. 2011. Anti-inflammatory effect of *Cornus walteri*. *Korean J Oriental Physiol & Pathology* 25: 982-988.
9. Choi WH, Park WY, Hwang BY, Oh GJ, Kang SJ, Lee KS, Ro JS. 1998. Phenolic compounds from the stem bark of *Cornus walteri* Wanger. *Kor J Pharmacogn* 29: 217-224.
10. Lim CS, Li CY, Kim YM, Lee WY, Rhee HI. 2005. The inhibitory effect of *Cornus walteri* extract against α -amylase. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 103-108.
11. Park WH, Cha YY. 2009. Effect of stem bark extracts of *Cornus walteri* Wanger on the lipid lowering, anti-oxidative activity and concentration of proinflammatory cytokines in rat fed high fat diet. *J Oriental Rehab Med* 19: 59-78.
12. Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
13. Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 40: 166-170.
14. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
15. Murrant CL, Reid MB. 2001. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 55: 236-248.
16. Kong SH, Choi YM, Kim YW, Kim DJ, Lee JS. 2009. Antioxidant activity and antioxidant components in methanolic extract from Geumjong rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 807-811.
17. Bueque JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310.
18. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal*

- Biochem* 190: 360-365.
19. Flohé L, Günzler WA. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-121.
 20. Fossati P, Prencipe L, Berti G. 1980. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem* 26: 227-231.
 21. Ukeda H, Kawana D, Maeda S, Sawamura M. 1999. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 485-488.
 22. Jeong CH, Jang ST, Joo OS, Lee SC, Shin YH, Shim KH, Cho SH, Choi SG, Heo HJ. 2009. Phenolic content, antioxidant effect and acetylcholinesterase inhibitory activity of Korean commercial green, puer, oolong, and black teas. *Korean J Food Preserv* 16: 230-237.
 23. Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 7-14.
 24. Joo YJ. 2013. Antioxidant activities of medicinal plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 512-529.
 25. Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.
 26. Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 75: 199-212.
 27. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.
 28. Kim MJ, Park EJ. 2011. Feature analysis of different *in vitro* antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1053-1062.
 29. Choi Y, Lee SM, Kim Y, Yoon J, Jeong HS, Lee J. 2010. A tocotrienol-rich fraction from grape seeds inhibits oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide in HepG2 cells. *J Med Food* 13: 1240-1246.
 30. Suttnar J, Másová L, Dyr JE. 2001. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 751: 193-197.
 31. Kim Y, Choi Y, Ham H, Jeong HS, Lee J. 2013. Protective effects of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from defatted grape seeds on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food Chem* 137: 136-141.
 32. Zhang XH, Choi SK, Seo JS. 2009. Effect of dietary grape pomace on lipid oxidation and related enzyme activities in rats fed high fat diet. *Korean J Nutr* 42: 415-422.
 33. Lima CF, Valentao PC, Andrade PB, Seabra RM, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. 2007. Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chem Biol Interact* 167: 107-115.
 34. Jiao HL, Ye P, Zhao BL. 2003. Protective effects of green tea polyphenols on human HepG2 cells against oxidative damage of fenofibrate. *Free Radic Biol Med* 35: 1121-1128.
 35. Bobek P. 1999. Dietary tomato and grape pomace in rat: effect on lipid in serum and liver, and on antioxidant status. *Br J Biomed Sci* 56: 109-113.
 36. Alía M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. 2006. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 212: 110-118.