

H₂O₂에 의해 유도된 HepG2 세포의 산화적 스트레스에 대한 신종 방사선 돌연변이 블랙베리 γ -B201의 세포 보호 효과

조병욱¹ · 이창욱^{1,2} · 소양강¹ · 진창현¹ · 육홍선² · 변명우³ · 정용욱⁴ · 박종천⁴ · 정일윤^{1,*}
¹한국원자력연구원 첨단방사선연구소, ²충남대학교 식품영양학과, ³우송대학교 외식조리영양학부,
⁴서남대학교 의과대학 미생물학교실

Protective Effect of Radiation-induced New Blackberry Mutant γ -B201 on H₂O₂-induced Oxidative Damage in HepG2 Cells

Byoung Ok Cho¹, Chang-Wook Lee^{1,2}, Yangkang So¹, Chang-Hyun Jin¹, Hong-Sun Yook²,
Myung-Woo Byun³, Yong-Wook Jeong⁴, Jong Chun Park⁴, and Il-Yun Jeong^{1,*}

¹Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute

²Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

³Department of Culinary Nutrition, Woosong University

⁴Department of Microbiology, College of Medicine, Seonam University

Abstract The objective of the present study was to investigate the chemical composition of anthocyanin-enriched extract of radiation-induced blackberry (*Rubus fruticosus* L.) mutant (γ -B201) as well as the protective effect of γ -B201 against oxidative stress *in vitro*. The cytotoxicity, reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity, and DNA damage were assessed by WST-1 assay, flow cytometry, and comet assay, respectively. Lactate dehydrogenase, superoxide dismutase, and catalase activities were determined by using a commercial kit. The *in vitro* results showed that γ -B201 increased the cell viability, reduction of lactate dehydrogenase release, and intracellular ROS scavenging capacity in hydrogen peroxide (H₂O₂)-treated HepG2 cells. Furthermore, treatment with γ -B201 attenuated DNA damage in H₂O₂-treated HepG2 cells and treatment with γ -B201 restored the activity of superoxide dismutase and catalase in H₂O₂-treated HepG2 cells. In conclusion, the present study suggests that γ -B201 blackberry extract can exert a significant cytoprotective effect against H₂O₂-induced cell damage.

Key words: blackberry, ROS, cell viability, DNA damage, antioxidant enzyme

서 론

블랙베리(blackberry, *Rubus fruticosus* L.)는 쌍떡잎식물 장미목 장미과 딸기속에 속하는 다년생 식물로서 줄기는 적갈색이며 성숙기에 달할수록 붉은색에서 검은색을 나타낸다. 주로 블랙베리는 북아메리카의 원생종을 개량하여 아시아 서부, 유럽, 아프리카 및 아메리카에서 재배되고 있다. 우리나라에서는 중부이남 특히 전북 고창, 정읍 및 제주도 등에서 재배되고 있다(1). 블랙베리는 식이섬유, 비타민, 무기질 등 필수 미량요소가 다량 함유되어 있으며, 생리활성을 가진 항기성분, 탄닌성분, 안토시아닌 성분, 트리테르펜성분 등을 가지고 있다(2). 최근 논문에서 의하면 생리활성을 갖는 성분들은 항암, 항알레르기, 항비만, 항산화, 항균 등의 기능성을 나타낸다고 보고되었다(3-5). 생리활성 기능 중 항

산화 기능은 산화적 스트레스에 의해 생성된 활성산소종을 불활성화하여 제거함으로써 금속이온 킬레이트 또는 LDL oxidation에 의해 발병되는 심혈관계 질환 및 노화, 간 질환 등의 개선효과가 있다고 보고되었다(6).

세계적인 경제성장으로 인해 경제수준이 향상되고 식생활의 변화에 따라 운동부족, 영양과잉 등으로 인한 각종 성인병 및 만성 질환이 지속적으로 증가 되고 있으며, 평균 수명의 연장으로 건강증진에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 따라 질병 예방과 노화 억제 등 생체 조절 기능이나 방어능력을 지닌 일부 성분들을 이용한 기능성 식품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 기능성식품은 의약품에서 나타나는 부작용을 최소화시키고 건강을 유지시키거나 질병 예방을 목적으로 하며 2000년 이후 기능성 식품 시장이 지속적으로 확대되고 있다(7). 생체 조절 기능을 갖는 약용식물은 체내에서 대사되며 대사산물을 통해 항균효과(8), 항산화효과(9) 및 항암효과(10) 등과 같은 생리활성을 나타낸다. 약용식물의 대표적인 생리활성 물질은 폴리페놀과 같은 플라보노이드로써 항산화효과를 가진 물질이다. 플라보노이드는 채소류, 과일류, 식물의 뿌리, 줄기, 잎 등의 다량으로 함유된 붉은색 계열의 색소로서 일반적으로 당과 결합된 배당체 형태로 존재한다(11,12).

블랙베리 열매는 항산화 및 함염중, 항암 등을 비롯한 다양한

*Corresponding author: Il-Yun Jeong, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

Tel: 82-63-570-3150

Fax: 82-63-570-3159

E-mail: iyjeong@kaeri.re.kr

Received January 28, 2014; revised April 1, 2014;

accepted April 4, 2014

생리활성 효과를 가진다고 보고되었으며(13), 생리활성에 기여하는 탄닌, 플라보노이드, 페놀성 화합물 등의 성분을 함유하고 있다고 알려져 있다(14). 블랙베리에 다량으로 함유되어 있는 cyanidin-3-*O*-glucoside (C3G)는 다른 안토시아닌에 비해 높은 항산화 효과를 지니고 있으며 암, 성인병 및 심혈관계 질환의 발병률을 감소시킨다고 보고되어 있다(15,16). 최근에, Cho 등(17)은 블랙베리 V-9 메이플에 총 안토시아닌 및 C3G 함량이 뛰어나다고 보고하였으며, Sprague-Dawley rats을 이용한 동물실험에서 블랙베리 V-9 메이플이 사염화탄소 유발 산화스트레스에 보호 효능을 나타낸다고 보고하였다. 감마선을 이용한 돌연변이 육종방법은 기존의 우량형질을 유지하면서, 육종가가 원하는 유전형질을 개량할 수 있고, 육종기간도 단축할 수 있는 장점을 지니고 있어, 화훼 및 과수류의 형질개량에 많이 이용되는 육종 방법이다. 최근 Ryu 등(18)의 보고에 의하면, 블랙베리 원품종 V-9으로부터 ⁶⁰Co 감마선을 80 Gy 선량으로 조사하여 돌연변이 육종한 γ -B201의 생육 및 형태학적 특성을 보면 원품종 V-9에 비해 개화기가 빠르고 과실크기가 작아진 반면, 당도는 증가한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 블랙베리 V-9으로부터 돌연변이된 γ -B201의 C3G 함량을 알아보고, 블랙베리 γ -B201 추출물을 이용하여 산화적 스트레스를 유발하는 H₂O₂를 처리한 인간 간암세포주 HepG2 세포에 대한 γ -B201의 세포보호 능력과 항산화효소 활성을 검증함으로써 간 기능 개선 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 블랙베리는 한국원자력연구원 방사선육종연구팀에서 블랙베리 V-9계통을 대상으로 하여 방사선 조사에 의해 돌연변이를 발생시킨 블랙베리 γ -B201을 전라북도 완주에서 재배하여 2012년도 8월에 수확한 것을 사용하였다. High performance lipid chromatography (HPLC, Agilent 1100 series quaternary pump, Boeblingen, Germany) 분석 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외 시약은 analytical grade를 사용하였다.

용매 추출

돌연변이 블랙베리 γ -B201과 원품종 V-9 건조중량 1g에 추출용매(EtOH:HCl=99:1) 10 mL를 가하여 4°C 암실에서 3일간 냉장 추출하였으며 추출액은 0.45 μ m membrane filter로 여과하였다. 이 과정을 3회 반복하였다.

HPLC를 이용한 C3G 함량 분석

돌연변이 블랙베리 γ -B201에 함유되어 있는 C3G 함량은 Cho 등(17)의 방법에 따라 HPLC를 이용하여 정량 분석하였다. 분석 column은 TSK-GEL ODF-100V (4.6×150 mm, 5 μ m, Tosoh, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 이동상 용매는 10% formic acid (A)와 100% acetonitrile (B)를 사용하였으며, gradient 조건은 0.5 min, 0% B; 4 min, 9% B; 10 min, 13% B; 20 min, 30% B; 21 min, 100% B로 하여 분석하였다. 주입량은 10 μ L, 유속은 1 min/mL, column 온도는 30°C이며, 검출기는 HPLC diode array detection를 사용하였고 흡광도는 530 nm로 설정하여 분석하였다. 표준곡선(calibration curve)은 C3G 표준물질을 각각의 다른 농도(1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL)로 사용하여 작성한 후 블랙베리의 C3G를 정량하는데 사용하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 세포는 인간 간암세포주인 HepG2로 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA)와 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 첨가한 DMEM (Hyclone)배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 세포 밀도가 90%로 포화되었을 때 trypsin-EDTA (Invitrogen)를 처리하여 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

Reactive oxygen species (ROS) 소거능

세포내 ROS 측정은 carboxy-H₂DCFDA (Invitrogen)를 사용하여 flow cytometry (Cytomics FC500, Beckman, Miami, FL, USA) 방법으로 측정하였다. HepG2 세포를 6 well plate에 최종농도가 1×10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음, γ -B201 추출물을 400 μ g/mL 농도로 처리한 후 배양하였다. 1시간 후 2 mM H₂O₂ (Sigma Chemical Co.)를 처리한 다음 30분 후 10 μ m carboxy-H₂DCFDA를 처리하였다. 15분 뒤 PBS로 세척한 다음 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 즉시 flow cytometry로 측정하였다.

Cell viability

세포생존율은 Ez-Cytox cell viability assay kit (DAEIL lab, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. 먼저 HepG2 세포를 96 well plate에 최종농도가 1×10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 γ -B201 추출물을 400 μ g/mL 농도로 전처리하여 1시간 배양하였다. 1시간 후 2 mM H₂O₂를 처리한 다음 24시간 배양하였다. 24시간 후 EZ-Cytox 시약 10 μ L를 넣고 4시간 동안 배양한 후 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포생존율은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다.

Lactate dehydrogenase (LDH) release 측정

LDH release는 LDH activity assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. 96 well plate에 HepG2 세포를 1×10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음, γ -B201 추출물을 400 μ g/mL 농도로 처리한 후 배양하였다. 1시간 후 2 mM H₂O₂를 처리한 다음 24시간 배양했다. 24시간 후 culture 배지 5 μ L를 96 well plate에 분주하고 assay buffer 45 μ L를 각 well에 넣었다. LDH substrate mix solution을 제조하여 50 μ L씩 분주하여 섞어준 후 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Comet assay

HepG2 세포를 100 mm dish에 최종농도가 1×10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음, γ -B201 추출물을 400 μ g/mL 농도로 처리하여 배양하였다. 1시간 후 2 mM H₂O₂를 처리한 다음 15분 후 PBS로 세척한 뒤 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 회수하였다. 반응이 끝난 HepG2 세포를 0.8% low melting-point agar (LMPA)와 섞은 후 0.5% normal melting-point agarose (NMA)가 미리 코팅된 슬라이드 위로 세포현탁액을 분산시킨 뒤 커버글라스를 덮어 4°C 냉장고에

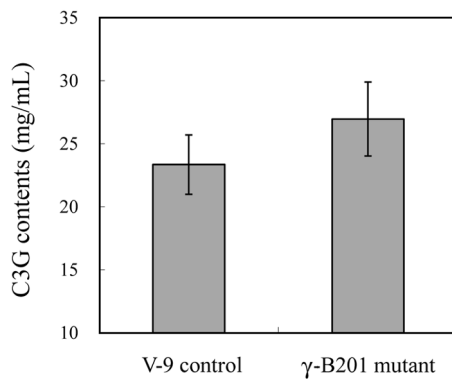


Fig. 1. Quantitative analysis of C3G in V-9 and γ-B201 blackberry extracts. Data are presented as the mean±SD.

보관하였다. Gel이 굳으면 커버글라스를 벗기고 TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% SDS)에 담가 암실에서 30분 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 후, TAE buffer가 채워진 전기영동 수조에 슬라이드를 넣고 60 V로 25분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 10 µg/mL propidium iodide (PI, Sigma Chemical Co.)를 100 µL씩 분주하고 커버글라스로 덮어 암실에서 10분간 염색하였다. 커버글라스를 벗기고 증류수로 세척한 뒤 400배 형광현미경(DM2500, Leica, Wetzlar, Germany)으로 이미지화하여 관찰하였다. 이미지 분석은 Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

항산화효소 활성 측정

Superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 효소 활성은 SOD 및 catalase assay kit를 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다.

결과 분석

모든 실험결과는 평균표준편차로 나타내었으며, 대조군과 실험군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Statistical analysis system (SAS, V9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 one way ANOVA법으로 분산분석을 실시하였으며, 조사항목들 간의 유의성 검증은 Duncan의 다중 검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

돌연변이 블랙베리 γ-B201의 C3G 함량

원품종 V-9과 돌연변이 품종 γ-B201 추출물을 HPLC로 측정된 결과, 원품종 V-9 추출물은 23.34±2.35 mg/g, 돌연변이 품종 γ-B201 추출물은 26.96±2.93 mg/g으로 γ-B201 돌연변이 품종이 V-9 원품종 보다 C3G 함량이 약 15% 상승된 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 Ryu 등(18)이 보고한 생육 및 형태학적 특성에 더하여 안토시아닌 함량이 높은 γ-B201 품종이 신품종 육종 소재로서 활용가치가 있고, 기능성 소재 활용 및 산업적인 이용 가능성이 충분할 것으로 생각되어 진다.

세포내 ROS 소거효과

ROS는 미토콘드리아에서 대사활동을 통해 생성되는 대사산물

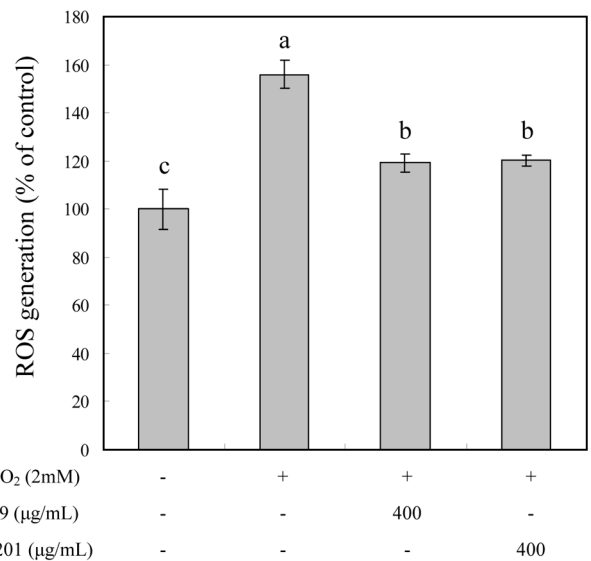


Fig. 2. Effect of γ-B201 blackberry extract on the generation of intracellular ROS levels in H₂O₂-treated HepG2 cells. Data are presented as the mean±SD. Means with same alphabet (a-c) are not significantly different at $p < 0.05$.

로서 반응성이 강하여 생체 내 신체의 구성물질과 쉽게 화학반응을 일으켜 산화적 스트레스를 유발하는 물질이다(19). HepG2 세포에 H₂O₂를 처리하여 생성된 ROS를 γ-B201 추출물의 직접적인 ROS 소거능을 확인하기 위하여 carboxy-H₂DCFDA를 사용하여 flow cytometry에서 측정하였다.

γ-B201과 V-9 추출물의 직접적인 ROS 소거능은 Fig. 2와 같다. H₂O₂를 처리하였을 때의 양성대조군은 약 155% ROS 생성이 증가하였고, γ-B201과 V-9 추출물을 400 µg/mL로 전처리한 경우 양성대조군에 비해 γ-B201은 약 120%로 V-9은 약 119%로 ROS 생성이 감소하였다. γ-B201과 V-9의 직접적인 ROS 소거능이 통계적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, 두 품종 모두 H₂O₂에 의해 생성된 ROS를 직접적으로 소거하는 것을 확인하였다. 안토시아닌 계열의 색소가 다량으로 함유된 과일과 야채는 항산화 효능을 나타낸다고 알려져 있다. Elisia 등(20)의 연구 결과에 따르면 INT-407 세포에 AAPH로 ROS를 유도하여 블랙베리 추출물을 처리한 결과 직접적인 ROS 소거능이 뛰어난다고 보고되었으며, Dai 등(21)의 연구결과에 따르면 H₂O₂로 ROS를 유발시킨 HL-60 세포에 파우더 형태의 블랙베리 추출물을 처리하였을 때 음성대조군과 비슷한 수준으로 ROS를 소거한다고 보고되었다. 따라서 H₂O₂를 처리하여 발생하는 ROS를 방사선 돌연변이 블랙베리인 γ-B201 추출물이 직접적으로 작용하여 감소시킴으로써 뛰어난 항산화 효능을 나타내는 것으로 판단된다.

산화적 스트레스에 의한 세포 독성 보호 효과

H₂O₂는 산화적 스트레스를 유발시키는 물질로서 *in vitro* 실험에 독성 유발 물질로 자주 이용된다(22). HepG2 세포에 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발시켜 γ-B201과 V-9 추출물에 대한 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 세포생존율을 확인하기 위하여 HepG2 세포에 γ-B201과 V-9 추출물을 400 µg/mL 농도로 전처리한 후 2 mM H₂O₂를 처리하여 확인하였다. HepG2 세포에 2 mM 처리할 경우 대조군과 대비하여 세포 생존율은 약 54%로 감소되었으며, γ-B201 추출물을 전처리한 결과 약 88.7%로 V-9 처리군은 약 83.7%로 세포생존율이 증가하였으며, γ-B201 품종

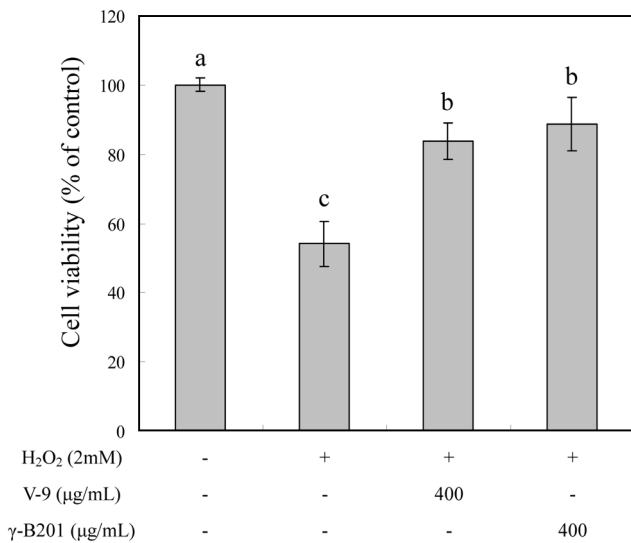


Fig. 3. Effect of γ -B201 blackberry extract on the cell viability in H_2O_2 -treated HepG2 cells. Data are presented as the mean \pm SD. Means with same alphabet (a-c) are not significantly different at $p < 0.05$.

이 V-9 품종에 비해 간세포 보호 효과가 조금 더 좋았다. Im 등(23)의 연구에 따르면 PC-12 세포에 H_2O_2 를 처리하여 유발된 산화적 스트레스를 복분자 딸기의 안토시아닌 성분이 이를 억제하여 세포생존율을 증가시킨다고 보고되었으며, Senevirathne 등(24)은 V79-4 세포에 H_2O_2 로 유발된 산화적 스트레스를 블루베리에 처리에 의해 세포생존율을 증가한다고 보고되었다. 따라서 복분자 딸기와 블루베리 등과 같은 속에 속하는 돌연변이 블랙베리인 γ -B201 추출물은 H_2O_2 처리로 인해 발생하는 산화적 스트레스를 감소시킴으로써 세포생존율을 증가시키는 것으로 판단된다. 세포생존율과 더불어 γ -B201의 간세포 보호 효과는 LDH에 의하여 확인되었다. LDH는 젖산탈수소효소로서 세포막의 투과성과 조직의 형태변화를 나타내는 것으로서 간 손상이 일어날수록 세포 밖으로 배출되며 간세포 손상 지표성분이다(25). γ -B201과 V-9 추출물이 손상된 간세포에 대한 보호 효과를 확인하기 위하여 LDH 방출 억제를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. H_2O_2 를 처리하였을 때 양성대조군은 약 136% 정도 LDH 방출을 나타내었고, γ -B201과 V-9을 400 μ g/mL 농도로 전처리할 경우 각각 약 105%, 약 117%로 LDH 방출이 억제되었으며, γ -B201 품종이 V-9 품종에 비해 보다 더 나은 LDH 방출 억제 효능을 나타내었다. Hwang 등(26)의 발표에 따르면 HepG2 세포에 tert-butyl hydroperoxide을 처리하여 간세포에 독성을 유발시킨 뒤 안토시아닌 색소가 많은 자색고구마 추출물을 처리할 경우 농도 의존적으로 감소하였으며, 200 μ g/mL에서는 약 50% 정도의 LDH 방출 억제 효과를 나타냈다. 이러한 연구 결과로 볼 때 손상된 간세포에 안토시아닌 색소가 다량 함유된 방사선 돌연변이 블랙베리인 γ -B201 추출물이 LDH 방출을 감소시키는 능력이 높을 것으로 사료되며, H_2O_2 에 의한 산화적 손상을 억제하여 간세포 보호 효과가 높다는 것으로 판단된다.

산화적 DNA 손상 보호효과

산화적 스트레스에 의한 산화적 DNA 손상 정도를 측정하기 위하여 comet assay를 실시하였다. HepG2 세포에 H_2O_2 를 처리하여 DNA damage를 유발시키는 방법은 널리 이용되고 있다(27). γ -B201 추출물의 산화적 DNA 손상 억제 효과를 확인하기 위하

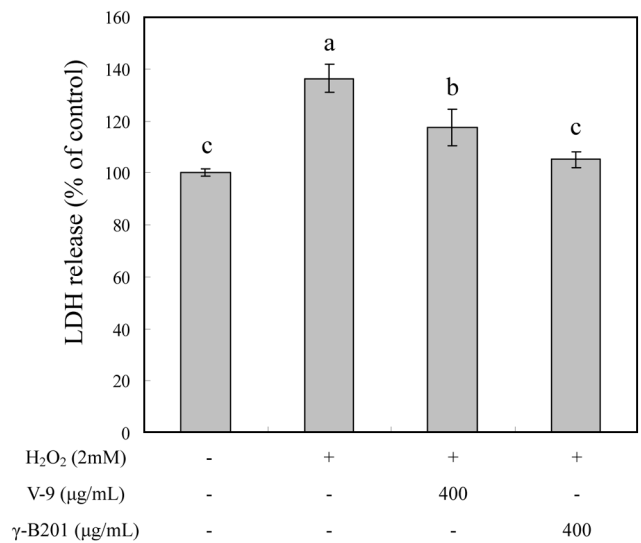


Fig. 4. Effect of γ -B201 blackberry extract on the release of LDH in H_2O_2 -treated HepG2 cells. Data are presented as the mean \pm SD. Means with same alphabet (a-c) are not significantly different at $p < 0.05$.

여 HepG2 cell에 H_2O_2 를 처리하여 산화적 DNA 손상을 유발시켰다. γ -B201과 V-9 추출물의 산화적 DNA 손상 억제 결과는 Fig. 5와 같다. HepG2 세포에 2 mM의 H_2O_2 를 처리하였을 때 DNA 손상지표인 tail length와 olive tail moment가 증가하였으나, γ -B201과 V-9 추출물을 400 μ g/mL 농도로 전처리할 경우 Fig. 5A와 같이 손상된 DNA 움직임이 감소하였으며, 증가된 olive tail moment (Fig. 5B) 역시 유의적으로 감소하였다. γ -B201과 V-9의 DNA 손상 억제 효능이 통계적으로 유의적인 차이는 없었으나, γ -B201 품종이 DNA 손상 억제 효능이 조금 더 높았다. Esselen 등(28)은 HT29 cell에 camptothecin와 doxorubicin를 처리하여 유도된 DNA 손상을 안토시아닌이 풍부한 블랙베리 추출물 및 C3G에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인하였다. 이러한 연구 결과는 블랙베리 추출물이 DNA 손상을 억제하는 것으로 사료되며 γ -B201 추출물은 H_2O_2 에 의한 산화적 DNA 손상을 억제하는 효과가 높은 것으로 판단된다.

항산화효소활성 측정

H_2O_2 처리에 의해 유발된 산화적 스트레스는 SOD와 CAT와 같은 항산화 효소 활성을 저하시킨다고 보고되어있다(29). SOD는 molecular oxygen (O_2)와 superoxide anion (O_2^-)와 같은 free radical을 hydrogen peroxide (H_2O_2)로 전환하여 CAT에 의해 H_2O 와 O_2 로 전환되어 배출된다. 따라서 H_2O_2 로 유발된 산화적 스트레스에 대한 γ -B201 추출물의 세포 보호 기전을 확인하기 위하여 항산화 효소계 물질인 SOD와 CAT의 활성을 측정된 결과는 Fig. 6, 7과 같다. HepG2 세포에 γ -B201과 V-9 추출물을 400 μ g/mL 농도로 전처리한 후 2 mM H_2O_2 를 처리하여 24시간 배양한 뒤 단백질을 추출하였다. H_2O_2 처리 시 SOD (Fig. 6)와 CAT (Fig. 7) 효소활성이 대조군과 대비하여 각각 약 83%와 약 77%로 감소하였으나 γ -B201과 V-9 추출물을 전처리하였을 때 SOD는 γ -B201이 약 110%로 V-9은 약 107%로 증가하였고 CAT는 각각 약 111%와 약 99%로 증가하였다. γ -B201 추출물을 처리한 SOD와 CAT의 활성은 H_2O_2 처리군과 비교하여 유의적으로 증가한 것을 확인하였으며, γ -B201 품종이 V-9 품종에 비해 보다 더 나은 항산화 효소 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 γ -B201 품

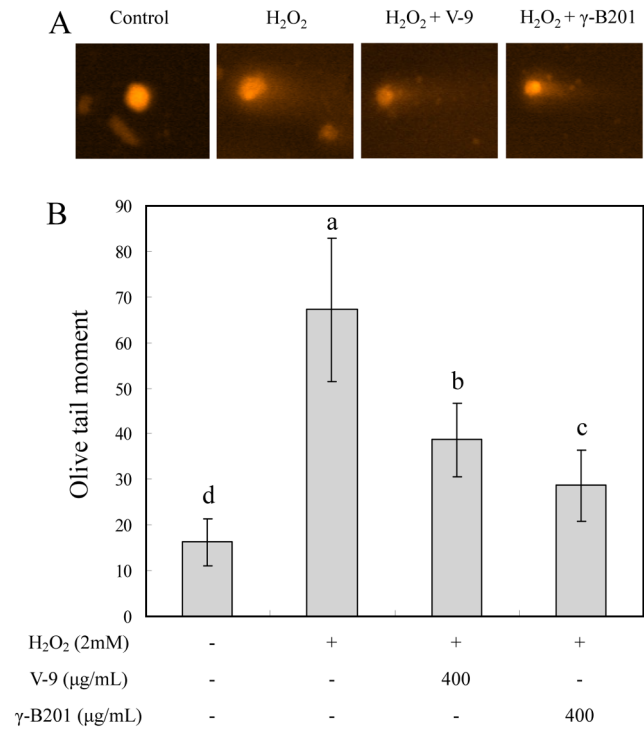


Fig. 5. Effect of γ -B201 blackberry extract on the DNA damage in H_2O_2 -treated HepG2 cells. (A) Representative images and (B) the percentage of DNA damage in H_2O_2 -treated HepG2 cells detected by the comet assay. Data are presented as the mean \pm SD of 100 comets in each group. Means with same alphabet (a-d) are not significantly different at $p < 0.05$.

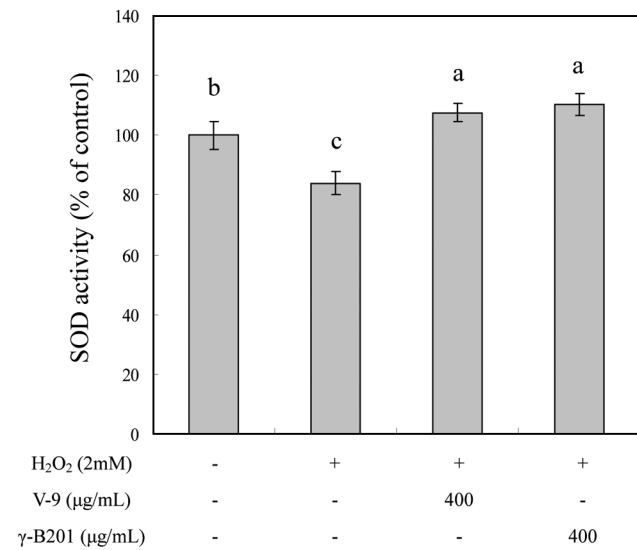


Fig. 6. Effect of γ -B201 blackberry extract on the SOD activity in H_2O_2 -treated HepG2 cells. Data are presented as the mean \pm SD. Means with same alphabet (a-c) are not significantly different at $p < 0.05$.

중이 V-9 품종에 비해 C3G 함량이 높기 때문일 것으로 생각된다. 기존의 연구결과에 따르면 Hwang 등(26)은 자색고구마 안토시아닌은 ROS를 직접적으로 소거할 뿐만 아니라 PI3K/Akt 와 ERK pathway를 통하여 항산화 시스템을 활성화 시켜 ROS를 간접적으로 제거함으로써 세포를 보호한다고 보고하였다. 또한,

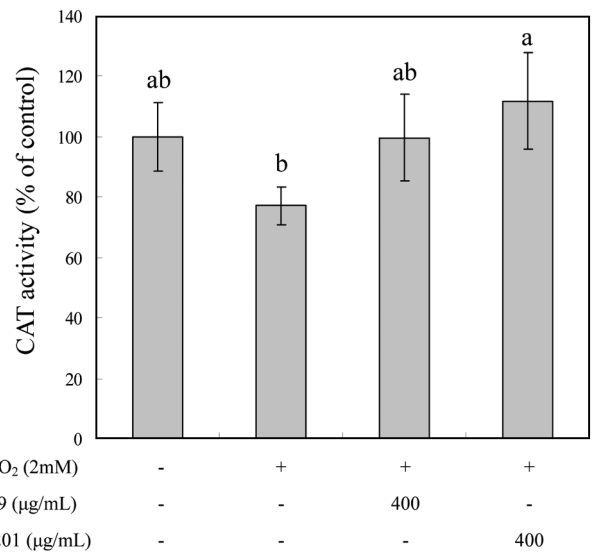


Fig. 7. Effect of γ -B201 blackberry extract on the CAT activity in H_2O_2 -treated HepG2 cells. Data are presented as the mean \pm SD. Means with same alphabet (a,b) are not significantly different at $p < 0.05$.

Murapa 등(30)은 keratinocyte에 UV로 유도된 산화적 손상을 안토시아닌이 다량으로 함유된 블랙베리 추출물을 처리하여 항산화 효소 활성을 측정된 결과 CAT, GPx, MnSOD와 같은 항산화 효소 발현을 증가시킴으로써 산화 손상을 억제하는 것으로 보인다고 보고하였으며, 이는 본 실험에 확인된 항산화 효소 발현과 유사한 경향을 보인다고 할 수 있었다. 따라서 HepG2 세포에 H_2O_2 에 의한 산화적 손상을 방사선 돌연변이 블랙베리인 γ -B201 추출물에 의한 항산화 효소의 활성이 관여하여 세포 보호 효과를 나타낸다고 판단된다.

요 약

본 연구에서는 인간 간암세포주 HepG2세포에서 H_2O_2 로 인해 유도된 산화적 스트레스에 대한 방사선 돌연변이 블랙베리 γ -B201 추출물의 세포보호 효능에 대하여 알아보려 하였다. γ -B201 추출물 처리 시 H_2O_2 로 처리된 HepG2 세포에서 ROS 생성이 억제되었으며, 세포 생존율을 증가시키고 LDH의 방출을 억제함을 확인하였다. Comet assay를 통해 DNA 손상 정도를 분석한 결과, H_2O_2 로 인해 유도된 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상은 γ -B201 추출물의 처리에 의해 감소하였다. 또한, HepG2 세포에 H_2O_2 처리에 의해 저하된 항산화 효소인 SOD와 CAT의 활성을 γ -B201 추출물에 의해 증가시킴으로써 H_2O_2 로 인해 유도된 산화적 스트레스로부터 HepG2 간세포를 보호하는 것으로 판단되며, γ -B201 추출물이 간 손상 보호 및 간 기능 개선 효과를 갖는 기능성 소재로서 활용될 수 있는 것으로 사료된다.

References

- Kim MJ, Kim HS, Lee UK. Selection of Korean black raspberry (*Rubus coreans* Miq.) for larger fruit and high productivity. J. Korean For. Soc. 91: 96-101 (2002)
- Park HJ, Jung HJ, Nam JH, Lim SC, Kim WB. Chemical characterization and utilization of 19 α -Hydroxyursane-type triterpenoids in *Rubus* species. Korean J. Plant Res. 19: 563-572 (2006)

3. Zhao JG, Yan QQ, Lu LZ, Zhang YQ. *In vivo* antioxidant, hypoglycemic, and anti-tumor activities of anthocyanin extracts from purple sweet potato. *Nutr. Res. Pract.* 7: 359-365 (2013)
4. Sarikaphuti A, Nararatwanchai T, Hashiguchi T, Ito T, Thaworanunta S, Kikuchi K, Oyama Y, Maruyama I, Tancharoen S. Preventive effects of *Morus alba* L. anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Exp. Ther. Med.* 6: 689-695 (2013)
5. Wu T, Yu ZP, Tang Q, Song HZ, Gao ZC, Chen W, Zheng XD. Honeysuckle anthocyanin supplementation prevents diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Food Funct.* 4: 1654-1661 (2013)
6. Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SJ, Lee KH. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of Bokbunja (*Rubus coreanum* F.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 790-796 (2005)
7. Ko EM, Kim BY. Antimicrobial activity of ϵ -polylysine mixtures against food-borne pathogens. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 705-710 (2004)
8. Kim YD, Kim KM, Hur CK, Kim ES, Cho IK, Kim KJ. Antimicrobial activity of garlic extracts according to different cooking methods. *Korean J. Food Preserv.* 11: 400-404 (2004)
9. Kim HY, Lee SH, Hwang IG, Kim TM, Park DS, Kim JH, Kim DJ, Lee JS, Jeong HS. Antioxidant activity and anticancer effects of rough rice (*Oryza sativa* L.) by germination periods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 14-19 (2012)
10. Jeong YJ, Kang KJ. Effect of *Angelica keiskei* extract on apoptosis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 1654-1661 (2011)
11. Kim YS, Choi HD, Choi IW. Antioxidative activities of Korean apple polyphenols. *J. Food Sci. Nutr.* 16: 370-375 (2011)
12. Chae JW, Jo BS, Joo SH, Ahn DH, Chun SS, Cho YJ. Biological and antimicrobial activity of *Vaccinium oldhami* fruit. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41(1): 1-6 (2012)
13. Bowen-Forbes CS, Zhang Y, Nair MG. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *J. Food Compos. Anal.* 23: 554-560 (2010)
14. Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agr. Food Chem.* 48: 140-146 (2000)
15. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agr. Food Chem.* 45: 304-309 (1997)
16. Cuevas-Rodriguez EO, Yousef GG, Garcia-Saucedo PA, Lopez-Medina J, Paredes-Lopez O, Lila MA. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.). *J. Agr. Food Chem.* 58: 7458-7464 (2010)
17. Cho BO, Ryu HW, Jin CH, Choi DS, Kang SY, Kim DS, Byun MW, Jeong IY. Blackberry extract attenuates oxidative stress through up-regulation of Nrf2-dependent antioxidant enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *J. Agr. Food Chem.* 59: 11442-11448 (2011)
18. Ryu JH, Kim DS, Ha BK, Kim JB, Kim SH, Jeong IY, Jo HJ, Kim EY, Kang SY. Growth characteristics and morphological variation analysis of mutant lines derived from gamma-ray and chemical mutagen treatments in *Rubus fruticosus* L. *J. Radiat. Ind.* 6: 257-265 (2012)
19. Choi CH, Won DH, Hwang JP, Park SN. Antioxidant effect of extract from different parts of *Juncus effusus* L. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 38: 275-282 (2012)
20. Elisia I, Hu C, Popovich DG, Kitts DD. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chem.* 101: 1052-1058 (2007)
21. Dai J, Gupte A, Gates L, Mumper RJ. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* 47: 837-847 (2009)
22. Sikander M, Malik S, Yadav D, Biswas S, Katara DP, Jain SK. Cytoprotective activity of a *trans*-chalcone against hydrogen peroxide induced toxicity in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 12: 2513-2516 (2011)
23. Im SE, Nam TG, Lee HJ, Han MW, Heo HJ, Koo SI, Lee CY, Kim DO. Anthocyanins in the ripe fruits of *Rubus coreanus* Muquell and their protective effect on neuronal PC-12 cells. *Food Chem.* 139: 604-610 (2013)
24. Senevirathne M, Kim SH, Jeon YJ. Protective effect of enzymatic hydrolysates from highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in Chinese hamster lung fibroblast cell line. *Nutr. Res. Pract.* 4: 183-190 (2010)
25. Kaczor JJ, Ziolkowski W, Poppingis J, Tarnopolsky MA. Anaerobic and aerobic enzyme activities in human skeletal muscle from children and adults. *Pediatr. Res.* 57: 331-335 (2005)
26. Hwang YP, Choi JH, Choi JM, Chung YC, Jeong HG. Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 49: 2081-2089 (2011)
27. Scolastici C, Lima ROA, Barbisan LF, Ferreira ALA, Ribeiro DA, Salvadori DMF. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol. In Vitro.* 22: 510-514 (2008)
28. Esselen M, Boettler U, Teller N, Bachler S, Hutter M, Rufer CE, Skrbek S, Marko D. Anthocyanin-rich blackberry extract suppresses the DNA-damaging properties of topoisomerase I and II poisons in colon carcinoma cells. *J. Agr. Food Chem.* 59: 6966-6973 (2011)
29. Zhang R, Chae S, Kang KA, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, Park DB, Park JW, You HJ, Hyun JW. Protective effect of butin against hydrogen peroxide-induced apoptosis by scavenging reactive oxygen species and activating antioxidant enzymes. *Mol. Cell. Biochem.* 318: 33-42 (2008)
30. Murapa P, Dai J, Chung M, Mumper RJ, D'Orazio J. Anthocyanin-rich fractions of blackberry extracts reduce UV-induced free radicals and oxidative damage in keratinocytes. *Phytother. Res.* 26: 106-112 (2012)