

LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 크랜베리 폴리페놀 분획물의 항산화 효과

- 연구노트 -

정하나¹ · 이기욱¹ · 황금택¹ · 곽호경²

¹서울대학교 식품영양학과, 생활과학연구소

²한국방송통신대학교 가정학과

Antioxidant Properties of Polyphenol Fractions from Cranberry Powder in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells

Hana Jung¹, Kiuk Lee¹, Keum Taek Hwang¹, and Ho-Kyung Kwak²

¹Department of Food and Nutrition, and Research Institute of Human Ecology, Seoul National University

²Department of Home Economics, Korea National Open University

ABSTRACT The objective of this study was to determine antioxidant properties of polyphenol fractions of cranberry powder employing lipopolysaccharides (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophage cells. Ethyl acetate fraction (EF) and methanol fraction (MF) of cranberry powder were prepared using a C18 Sep-Pak cartridge. When cells were treated with LPS for 20 h, intracellular reactive oxygen species (ROS) and DNA damage significantly increased. In cells pre-treated with EF, MF, and total fraction (TF: combining EF and MF), significant reductions of intracellular ROS were observed. The tested fractions reduced LPS-induced DNA damage measured by Hoechst staining. In addition, LPS-induced DNA oxidation was attenuated when cells were pre-treated with TF and MF. However, there was no significant difference in LPS-induced superoxide dismutase activity.

Key words: cranberry, polyphenol, antioxidant, inflammation

서 론

염증반응은 박테리아나 바이러스 같은 외부물질이 체내로 유입되었을 때 일어나는 생체 방어 반응으로 각종 조직세포와 면역세포가 이 과정에서 염증 매개 물질을 분비하는 작용을 한다. 하지만 염증 관련 세포에서 염증 매개 물질이 과도하게 생성되면 이는 만성 염증성질환의 원인이 된다(1,2). 특히 lipopolysaccharide(LPS)나 면역세포들이 분비하는 사이토카인에 의하여 활성화된 대식세포는 nuclear factor kappa B의 활성화로부터 이어지는 강한 염증반응을 일으키며, 과도한 inflammatory cytokine, nitric oxide, prostaglandin E₂를 생성함으로써 만성적인 염증반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(2-4).

또한 염증반응은 체내에서 산화적 스트레스를 유발하기도 하는데, LPS로 활성화된 대식세포는 염증성 물질뿐만 아니라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 과잉 생성하여 염증반응으로 인한 산화적 스트레스도 증가시킨다(5). 이러한 산화적 스트레스의 증가는 세포 내의 항산화 방어체계와 ROS 간의 불균형을 초래하며 세포와 조직의

단백질, 지질, DNA를 산화적으로 손상시켜 만성 염증성질환의 중요한 요인이 되는 것으로 알려져 있다(1,6). 또한 ROS는 단순한 산화적 손상을 유발할 뿐만 아니라 세포 내의 필수적인 2차 신호전달물질로써 특정 inflammatory cytokine이나 염증반응의 신호 전달에 중요한 역할을 수행한다(5). 이것은 LPS나 tumor necrosis factor- α 를 처리했을 때 세포 내의 ROS가 증가하고, 항산화 물질을 처리하였을 때 이러한 염증반응에 의한 세포자멸사가 감소하는 반응을 통해서 확인되었다. 그리고 염증반응으로 세포 내에서 발생한 ROS가 단백질의 산화환원반응을 변화시킴으로써 산화적 스트레스를 증가시키는 것도 확인되었다(1,5,6). 따라서 ROS를 제거할 수 있는 항산화제의 섭취는 산화적 스트레스를 감소시켜 만성적인 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 보고되고 있으며(1,7), 플라보노이드와 폴리페놀은 LPS로 자극한 대식세포가 생성한 ROS를 제거할 뿐만 아니라 ROS의 발생 또한 조절하여 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 수 있음이 보고되었다(8-10).

크랜베리는 요로감염을 포함한 감염성 질환의 예방에 도움을 주며 심혈관계 질환과 같은 만성 염증성 질환을 완화하는 등의 다양한 생리활성을 가졌으며, anthocyanidin, proanthocyanidins, quercetin과 같은 항산화제를 많이 함유하고 있어 높은 항산화 및 항염증 효과가 있다(11-13). 특히 크랜베리가 함유하고 있는 폴리페놀은 LPS로 자극한

Received 28 April 2015; Accepted 7 July 2015

Corresponding author: Ho-Kyung Kwak, Department of Home Economics, Korea National Open University, Seoul 110-791, Korea
E-mail: hkkwak@knou.ac.kr, Phone: +82-2-3668-4649

대식세포와 단핵구에서 proinflammatory cytokine의 생성을 효과적으로 억제했으며(3,4,14), 그중에서도 proanthocyanidin은 다양한 종류의 균에서 분리한 LPS로 자극한 대식세포에서 nitric oxide와 ROS 생성을 억제하여 크랜베리가 염증으로 인한 산화적 스트레스를 감소시킬 수 있음을 보고했다(15). 반면 Kim 등(16)의 연구에서는 LPS를 처리하고 고지방식이를 섭취한 동물 모델에서 크랜베리 분말의 보충이 혈중 interleukin-1 β 는 유의적으로 감소시키지만 nitric oxide에는 영향을 주지 않았다.

이처럼 크랜베리의 항염증 활성에 관한 다양한 연구가 진행되어 있으나 염증반응으로 유발되는 산화적 스트레스 억제 효과에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW264.7 macrophage cell line을 이용하여 크랜베리 분말에서 분리한 폴리페놀 분획물의 산화적 스트레스 및 DNA 손상 억제 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시료 제조

크랜베리 분말은 Kiantama Oy(Suomussalmi, Finland)에서 구입하여 실험에 사용하였으며, 폴리페놀 분획물은 Lacombe 등(17)과 Kalt 등(18)의 방법을 변형하여 분리하였다(Fig. 1). 크랜베리 분말 5 g을 취하여 50 mL의 증류수에 녹인 후 5,000 \times g에서 5분간 원심분리 하여 상층부를 Whatman No. 1 여과지(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과하였다. 여과액 3 mL를 0.01% HCl(v/v) 메탄올 용액 3 mL와 0.01 N HCl 수용액 3 mL로 활성화시킨 C18 Sep-Pak cartridge(6 cc, Waters Assoc., Milford, MA, USA)에 주입하였다. 먼저 3 mL의 0.01 N HCl 수용액으로 당과 산을 제거하고 6 mL의 ethyl acetate를 흘려주어 phenolic acids를 함유한 ethyl acetate fraction(EF)을 얻었으며, 0.01% HCl 메탄올 용액 6 mL를 흘려주어 anthocyanin과 proanthocyanidin을 함유한 meth-

anolic fraction(MF)을 얻었다. 위의 과정을 반복하여 분획물을 얻어낸 후 EF와 MF를 0.5 mL씩 취해 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 high performance liquid chromatography(HPLC) 분석에 사용하고, 나머지 분획물은 speed vacuum concentrator(ScanSpeed 40, LaboGene Aps, Lyngø, Denmark)를 이용하여 500 rpm, -110°C trap에서 건조한 후 -20°C에 보관하였다가 세포실험에 사용하였다.

HPLC는 Nova-pak C18 column(3.9 \times 300 mm, 4 μ m, Waters Assoc.)과 diode array detector가 장착된 Waters 2695 HPLC system(Waters Assoc.)을 사용하였다. 이동상은 5% formic acid(용매 A, HPLC grade, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)와 acetonitrile(용매 B, HPLC grade, J.T. Baker)을 사용하였다. 용매의 gradient는 0~1 min, 2~10% 용매 B(linear); 1~15 min, 10~12.5% 용매 B; 15~20 min, 12.5~60% 용매 B; 20~25 min, 60~2% 용매 B; 25~30 min, 2% 용매 B로 하였다. 유속은 1 mL/min으로 유지하였고 시료 주입량은 20 μ L였으며, DAD 스펙트럼에서 최대파장을 확인한 후 두 종류의 분획물을 모두 360 nm와 520 nm에서 측정하였다.

세포 배양 및 MTT assay

본 실험에 사용한 RAW264.7 세포는 DMEM(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하였으며, 5% fetal bovine serum(Gibco BRL)과 1% penicillin/streptomycin(Gibco BRL)을 첨가하여 37°C의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 증식하면 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 씻어낸 후, scraper를 사용하여 계대배양하였다. 본 실험에 사용한 MTT assay는 Mosmann(19)의 방법에 따라 배양한 RAW264.7 세포를 96 well plate에 각각 5 \times 10⁴ cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양한 후에 각 well의 배양액을 suction 하고, EF, MF, total fraction(TF, EF+MF)을 0.1~1 mg/mL 농도로 녹인 무혈청 DMEM-F12(Gibco BRL) 배지를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich Co.) 용액 10 μ L와 무혈청 DMEM-F12 배지 100 μ L를 넣어 2시간 동안 배양한 다음 기존 배지를 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich Co.)를 100 μ L씩 넣고 20분간 상온에서 반응시켰다. 반응시킨 96 well plate를 충분히 교반하고 microplate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 대조군 세포를 100%로 하였을 때와 비교하여 상대적인 세포성장 억제율로 나타내었다. LPS를 처리한 RAW264.7 세포의 독성은 위와 같은 MTT assay를 이용하였고, EF, MF, TF를 1~20 μ g/mL의 농도로 처리

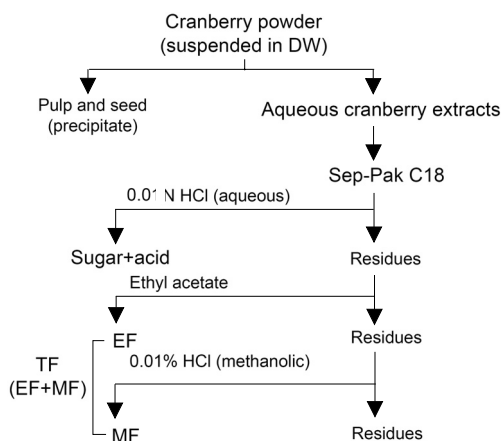


Fig. 1. Flowchart of fractionation. EF, ethyl acetate fraction; MF, methanolic fraction; TF, total fraction.

하여 4시간 배양한 다음 0.1 µg/mL의 LPS를 주입하고 20시간 배양하여 분석하였다.

Intracellular ROS 측정

Black 96 well plate에 5×10^4 cells/well의 RAW264.7 세포를 분주한 후 MTT assay와 같은 방법으로 배양하고, EF, MF, TF를 20 µg/mL로 처리하여 4시간 배양한 다음 0.1 µg/mL의 LPS를 주입하고 20시간 배양하였다. DMEM-F12로 배양이 끝난 세포를 씻어낸 후 5 µg/mL 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA, Sigma-Aldrich Co.)를 배지에 첨가하여 인큐베이터에서 30분 동안 배양하였다.

배양 후 4°C의 PBS로 씻어낸 세포를 형광현미경(FSX 100, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰 및 촬영하고 fluorescence microplate reader(FLUOstar Optima, BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 ROS 생성량을 측정하였다. Flow cytometry를 이용한 ROS 측정 실험은 black 12 well plate에 2×10^5 cells/well의 RAW264.7 세포를 분주한 후 위와 같은 방법으로 수행하였으며, PBS(pH 7.4)로 세척한 세포는 scraper를 이용하여 수확한 후 BD Accuri C6 flow cytometer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 10,000개의 세포를 기준으로 FL-1로 분석하였다.

DNA 손상 실험

2×10^5 cells/well의 RAW264.7 세포를 분주한 다음 위와 같은 방법으로 배양하고, DMEM-F12로 세포를 씻어낸 후 30분 동안 Hoechst 33258(5 µg/mL, Sigma-Aldrich Co.)을 넣어 인큐베이터에서 배양하고, 다시 DMEM-F12로 Hoechst를 씻어낸 후 fluorescence microscope(FSX 100, Olympus)로 DNA 손상 상태를 확인하였다. 단세포 전기영동법(Comet assay)도 위와 같은 방법으로 세포를 배양하였으며, PBS로 세척한 세포는 scraper를 이용하여 수확하였다. 수확한 1×10^5 cells/mL의 세포를 37°C의 0.5% low melting agarose와 1:10(v/v)의 비율로 혼합한 후 50 µL를 취하여 comet slide(Trevigen, Gaithersburg, MD, USA)에 분주하고 4°C의 암소에서 10분간 응고시켰다. 그리고 슬라이드를 4°C에서 30분간 comet lysis solution에 담가 세포를 용해시킨 후, 상온에서 20분 동안 electrophoresis buffer(300 mM NaOH; 1 mM EDTA, pH 13)에 담가 DNA를 unwinding 시켰다. 4°C의 전기영동 chamber에 슬라이드를 넣고 21 V에서 30분 동안 전기영동 한 후, 증류수와 70% ethanol로 5분씩 행꼐다. 슬라이드를 건조한 후 100 µL의 SYBR Gold(0.5 µg/mL, Trevigen) 용액으로 30분간 염색하고, 슬라이드를 증류수로 씻었다. 염색된 슬라이드는 건조한 후 형광현미경(FSX100, IX71, Olympus)으로 DNA 손상을 관찰하고, Comet Image Analysis Sys-

tem(version 5.5, Kinetic Imaging, Nottingham, UK)을 이용하여 DNA 손상에 의한 comet 형성을 측정하였다.

SOD 활성 측정

SOD 활성은 SOD assay kit(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)을 사용하여 수행하였다. Comet assay와 같은 방법으로 수확한 세포를 RIPA buffer로 lysis 하였다. 세포 lysate를 96 well plate에 10 µL씩 분주한 후 WST working solution을 200 µL 넣고 혼합한 다음 enzyme working solution을 20 µL를 첨가하여 37°C에서 20분간 incubation 한 후 450 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 대조군 실험은 효소 대신 10 µL dilution buffer를 넣었으며, SOD 활성은 시료군과 대조군 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SOD activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

통계분석

실험 결과의 통계처리는 SPSS program(version 12.0, SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way ANOVA test 및 Duncan's multiple range test를 하였다.

결과 및 고찰

크랜베리 분말 분획 성분

크랜베리 분말에서 분리한 EF와 MF를 HPLC-DAD의 UV 스펙트럼으로 분석한 결과 EF와 MF는 각각 360 nm와 520 nm에서 최대 피크를 보였고, 두 분획물을 각 파장으로 분석한 크로마토그램은 Fig. 2에 나타냈다. EF는 520 nm 파장에서 아무것도 검출되지 않은 것으로 보아 anthocyanin과 proanthocyanidin이 제거된 phenolic acid 분획이고, MF는 520 nm 파장에서 주요 피크가 모두 검출되어 anthocyanin과 proanthocyanidin을 함유하고 있는 분획임을 확인했다. 이것은 C18 cartridge를 이용하여 크랜베리와 다른 과일에서 폴리페놀 분획을 분리한 Kalt 등(18)과 Lacombe 등(17)의 연구와도 유사한 결과였다. Lacombe 등(17)은 본 연구와 유사한 방법으로 분리한 크랜베리를 포함한 12종의 과일의 phenolic 성분을 280 nm(total phenolics), 320 nm(hydroxycinnamates), 365 nm(flavonols), 520 nm(anthocyanins)에서 분석하였고, 크랜베리 폴리페놀 분획의 최대 흡수 파장은 365 nm이며, 특히 trimer와 tetramer와 같은 oligomer 형태의 프로안토시아니딘이 많이 함유되어 있다고 보고했다. 또한 선행 연구들은 크랜베리가 anthocyanins, flavonols(queretin-3-β-galactoside, queretin-3-rhamnopyranoside, myricetin-3-β-galactoside), proanthocyanidins(epicatechin, epicatechin-(4β→8, 2β→O→7)-epicatechin, epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→8, 2β→O→7)-epicatechin, hydroxycin-

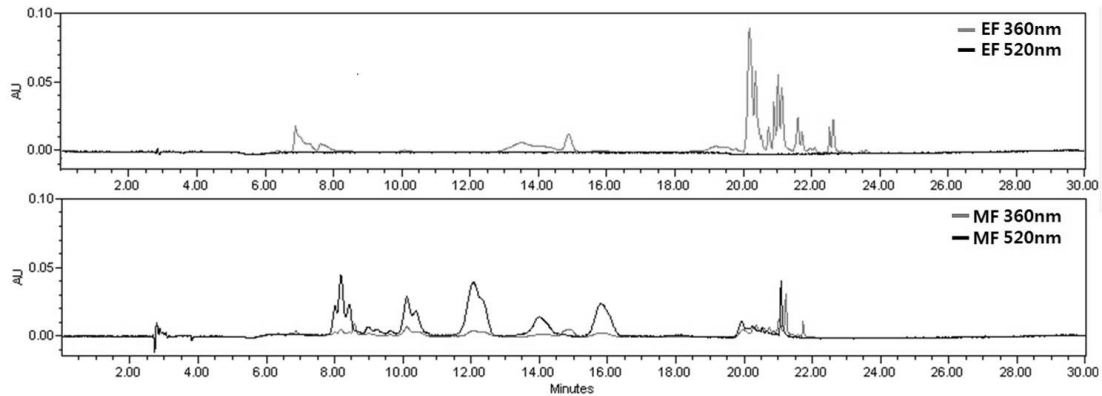


Fig. 2. HPLC chromatograms of polyphenol fractions of cranberry powder. EF, ethyl acetate fraction; MF, methanolic fraction.

namates를 주요 flavonoids로 함유하고 있는 것으로 보고했다(11-13). 본 연구에서는 크랜베리 분말에서 분리된 EF, MF, TF를 DMEM-F12 배지에 녹여 세포 실험에 사용하였다.

크랜베리 분말 분획의 세포독성

크랜베리 분말에서 분리한 분획물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였으며(19), 세 가지 분획물 모두 0.5 mg/mL 이하의 농도에서는 세포독성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 3, $P>0.05$). 또한 LPS를 처리한 세포로 MTT assay를 수행하여 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에 의한 세포독성이 없는 것을 확인하였고, 세 가지 분획물을 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 RAW264.7 세포에 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 사용하여 염증을 유발시키고 세포독성이 없음을 확인하였다.

Intracellular ROS

DCF-DA는 세포 안으로 쉽게 들어가고 세포막을 통과하여 세포 내의 ROS와 반응하여 형광을 띠는 DCF를 생성한

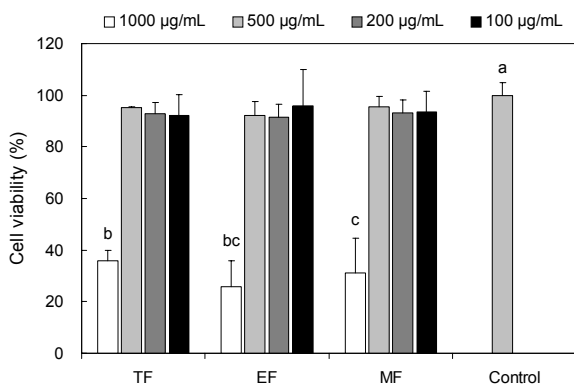


Fig. 3. Cell viability in RAW264.7 cells treated with polyphenol fractions of cranberry powder. Values are the mean \pm standard deviation of three measurements. Values with different letters (a-c) within the same concentrations differ significantly ($P<0.05$ by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test). EF, ethyl acetate fraction; MF, methanolic fraction; TF, total fraction.

다. LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 크랜베리 분획물이 염증반응으로 증가되는 ROS를 저하할 수 있는지 확인하고자 세포 내의 DCF를 다양한 방법으로 측정하여 비교하였다(Fig. 4). 먼저 세포의 ROS 생성을 확인하였을 때 LPS를 처리하지 않은 세포는 DCF로 염색된 세포가 적었고, LPS로 자극한 세포는 DCF로 염색된 세포가 많은 것으로 보아 염증반응으로 인한 ROS 생성이 활발한 것을 알 수 있었다. 또한 flow cytometry를 이용하여 DCF-DA로 염색한 세포를 분석한 결과 처리한 LPS의 농도가 증가함에 따라 DCF-DA로 염색된 세포가 점차 증가하였다. Flow cytometry와 fluorescence microplate reader를 이용하여 분석한 결과 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EF, MF, TF를 처리하고 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS로 자극한 세포의 ROS 생성량은 LPS만 처리한 세포보다 유의적으로 낮았고, 이것은 염증을 유발하지 않은 세포의 ROS 생성 수준과 비슷한 정도였다($P<0.05$).

이러한 결과는 크랜베리 폴리페놀 분획물의 항산화 활성이 염증을 유발한 세포 내에서도 유효하며, 염증반응으로 인해 발생하는 ROS 생성을 감소시켜 과도한 염증반응을 감소시킬 수 있음을 나타낸다. 이것은 크랜베리에서 분리한 proanthocyanidin 분획물이 균에서 분리한 세포벽과 LPS로 자극한 대식세포의 세포독성을 감소시켰으며, 이것은 크랜베리가 염증으로 인한 nitric oxide와 ROS 생성을 감소시켜서 나타난 보호 효과일 수 있음을 보고한 연구와도 유사한 결과이다(15). 또한 Kim 등(8)은 플라보노이드와 폴리페놀을 많이 함유하고 있는 과일 추출물이 LPS로 자극한 RAW264.7 세포의 ROS를 포착하고 제거할 뿐만 아니라 transcription factor의 발현을 조절하여 ROS 발생을 미연에 방지함으로써 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 수 있다고 하였다.

DNA 손상

LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 크랜베리 분획물이 염증반응으로 인한 DNA 손상을 저하할 수 있는지 확인하고자 세포 내의 DNA를 Hoechst 염색과 Comet assay로 분석하였다(Fig. 5). 형광현미경으로 Hoechst로 염색한 세포핵

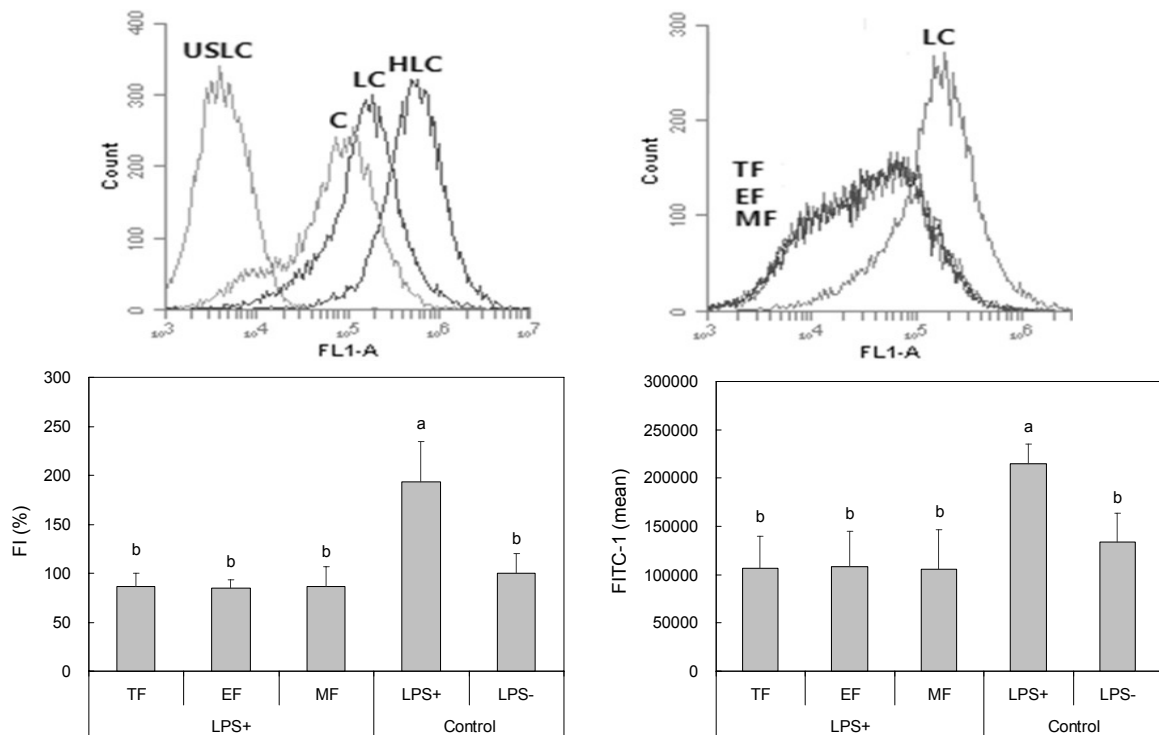


Fig. 4. Intracellular ROS generation in LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)-stimulated RAW264.7 cells pretreated with polyphenol fractions (20 $\mu\text{g/mL}$) of cranberry powder. Values are the mean \pm standard deviation of three measurements. Values with different letters (a,b) above bars differ significantly at $P<0.05$ by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. USLC, unstained LPS control; C, control; LC, LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)-stimulated control; HLC, high LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)-stimulated control; TF, total fraction; EF, ethyl acetate fraction; MF, methanolic fraction.

의 형태를 확인하였을 때 LPS로 자극한 세포는 핵의 DNA 응축과 분절이 많은 것으로 보아 염증 반응으로 인하여 DNA가 손상된 것을 알 수 있었다. 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 EF, MF, TF를 처리하고 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS로 자극한 세포의 핵은 LPS만 처리한 것보다 DNA 손상이 적은 것으로 관찰되었다.

본 연구에서 이용한 Comet assay는 DNA 손상에 관련된 다양한 연구에 응용되는 기법으로 세포 수준에서의 DNA 손상 정도를 민감하게 감지해낼 수 있으며, 염색된 DNA의 head와 손상된 DNA가 전기영동으로 이동된 형태가 혜성의 모습을 닮아 Comet assay라고 불린다. 따라서 DNA의 손상도는 tail의 길이 및 양에 따라 결정된다(6). 50개 세포의 DNA 손상도를 측정하여 그 평균값을 tail moment로 나타내며, olive tail moment는 tail에 존재하는 DNA의 양을 말한다. LPS를 처리한 세포에서 Comet assay를 실시한 결과 DNA의 손상 정도에 따라 다양한 형태의 핵 모양을 관찰할 수 있었으며, LPS를 처리한 세포는 DNA가 손상되어 파괴된 DNA 조각이 전기영동에 의해 긴 꼬리를 가진 혜성 모양을 형성하였다. 또한 Comet Image Analysis System을 이용하여 DNA의 손상을 분석한 결과 LPS로 자극한 세포의 olive tail moment와 tail length가 증가되었으며, TF와 MF 분획물을 처리했을 때 세포의 DNA 손상이 감소되는 경향을 확인할 수 있었으나 유의적인 차이는 없었다. 이 결과는 anthocyanin과 proanthocyanidin을 많이 함유하고 있는 MF

가 염증반응에 의한 산화적 DNA 손상을 억제할 수 있을 것임을 나타내며, 블랙라즈베리에서 분리한 안토시아닌 분획과 cyanidin-3-glucoside가 H_2O_2 로 자극한 RAW264.7 세포의 DNA 손상을 억제했다는 선행 연구 결과와도 유사한 결과이다(20,21). 또한 Yen 등(22)은 허브 뿌리에서 분리한 폴리페놀 분획이 sodium nitroprusside로 자극한 RAW264.7의 DNA 손상을 감소시켰으며, 이를 폴리페놀의 항산화능과 nitric oxide 소거능에 의한 것으로 보고했다.

SOD 활성

LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 크랜베리 분획물이 염증반응으로 인한 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 확인하고자 세포 내의 SOD 활성을 분석하였고, LPS를 처리하지 않은 세포의 SOD 활성(7.2 ± 3.7 U/mg protein)보다 LPS를 처리한 세포의 SOD의 활성(13.8 ± 8.0 U/mg protein)이 증가했다. 이 결과로 LPS로 인한 산화적인 스트레스에 대한 반응으로 SOD 활성이 증가함을 확인했다. 하지만 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 EF, MF, TF를 처리하고 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS로 자극한 세포의 SOD 활성은 각각 11.8 ± 8.6 , 14.6 ± 8.4 , 12.7 ± 7.3 U/mg protein으로 LPS만 처리한 세포와 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$).

Sangha(23)는 크랜베리에서 분리한 폴리페놀 분획이 LPS(10~20 $\mu\text{g/mL}$)로 자극한 THP-1 세포의 산화적인 스

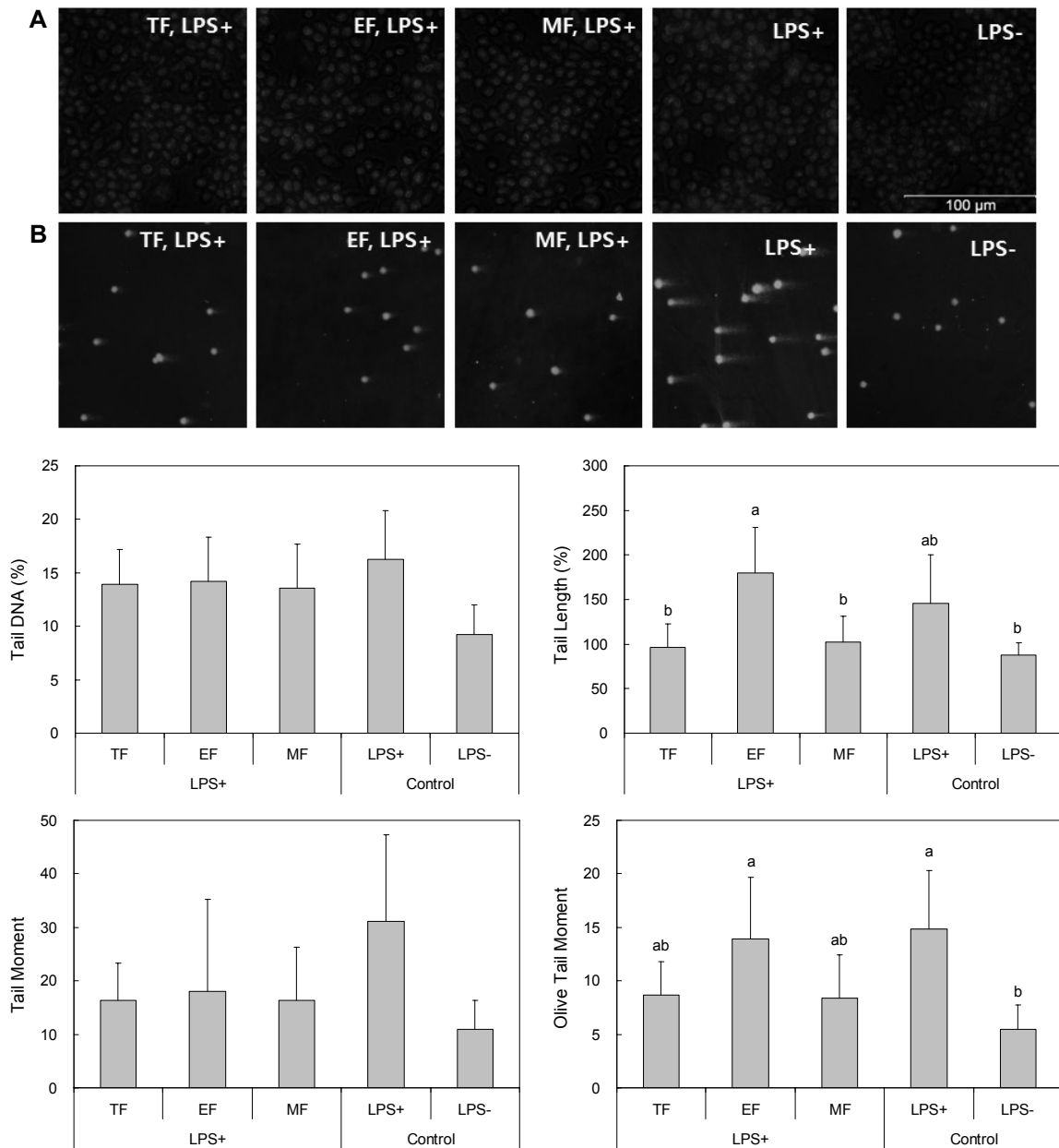


Fig. 5. Intracellular DNA fragmentation (Hoechst, A) and DNA oxidation (comet assay, B) in LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)-stimulated RAW264.7 cells pretreated with polyphenol fractions (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of cranberry powder. Values are the mean \pm standard deviation of three measurements. Values with different letters (a,b) above bars differ significantly at $P<0.05$ by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. EF, ethyl acetate fraction; MF, methanolic fraction; TF, total fraction.

트레스를 감소시켜 SOD 활성을 유의적으로 감소시켰다고 보고했다. 그러나 본 연구에서는 LPS(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 자극한 RAW264.7 세포에 EF와 TF를 처리했을 때 세포 내의 ROS는 감소했으나 SOD 활성의 유의적인 감소는 나타나지 않았다. 이와 유사한 결과는 LPS를 처리한 *db/db* 동물에서 크랜베리 건조물의 섭취가 간 조직액의 SOD 활성에 영향을 주지 않았다는 Kim 등(24)의 연구에서도 관찰된 바 있다.

이러한 연구 결과를 통해 크랜베리 함유 폴리페놀은 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 발생하는 ROS와 DNA 손상을 억제할 수 있음을 확인하였다. 그러므로 본 연구의 결과

를 배경으로 크랜베리가 염증반응으로 발생한 ROS에 의한 단순한 산화적 손상뿐만 아니라 염증반응에서 신호 전달이나 산화환원반응의 변화에 미치는 영향에 대한 깊이 있는 연구가 필요한 것으로 보인다.

요 약

본 연구의 목적은 LPS로 자극한 RAW264.7 세포를 이용하여 크랜베리에서 분리한 폴리페놀 분획물의 항산화능을 분석하는 것이었다. 크랜베리 분말의 에틸 아세테이트 분획

(EF)과 메탄올 분획(MF)은 C18-Sep-Pak 카트리지를 사용하여 분리했다. 20시간 동안 LPS로 자극한 RAW264.7 세포는 활성산소종(ROS)과 DNA 손상이 유의하게 증가하였으며, EF, MF 및 TF(EF+MF)로 전처리하고 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서는 ROS와 DNA 손상이 유의적으로 감소했다. 그러나 superoxide dismutase의 활성에는 차이가 없었다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 한국방송통신대학교 학술연구비 지원을 받아 작성된 것이다.

REFERENCES

1. Tak PP, Firestein GS. 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7-11.
2. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100: 171-194.
3. Bodet C, Chandad F, Grenier D. 2006. Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res* 85: 235-239.
4. Muller CE, Khoo C, Percival SS. 2010. Cranberry polyphenols down-regulate the toll-like receptor 4 pathway and NF-κB activation, while still enhancing tumor necrosis factor α secretion. *FASEB J* 24: 332.2.
5. Chapple IL. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 24: 287-296.
6. Hemnani T, Parihar MS. 1998. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol* 42: 440-452.
7. Widén C, Ekholm A, Piwowar-Zail D, Rumpunen K. 2010. Antioxidant activity of polyphenol rich fruits on human erythrocytes. Abstract No. 926 presented at X X VIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People International Symposium, Lisbon, Portugal.
8. Kim YH, Lee MJ, Lee HS, Kim JG, Park WH. 2011. Suppressive effect of *Euryale ferox* salisbury extracts on inflammatory response in LPS-stimulated RAW264.7 cells through the antioxidative mechanism. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25: 202-211.
9. Cíz M, Pavelková M, Gallová L, Králová J, Kubala L, Lojek A. 2008. The influence of wine polyphenols on reactive oxygen and nitrogen species production by murine macrophages RAW 264.7. *Physiol Res* 57: 393-402.
10. Youdim KA, McDonald J, Kalt W, Joseph JA. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *J Nutr Biochem* 13: 282-288.
11. Singh AP, Wilson T, Kalk AJ, Cheong J, Vorsa N. 2009. Isolation of specific cranberry flavonoids for biological activity assessment. *Food Chem* 16: 963-968.
12. Reed J. 2002. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42: 301-316.
13. Neto CC. 2007. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res* 51: 652-664.
14. Bodet C, Chandad F, Grenier D. 2007. Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 115: 64-70.
15. La VD, Labrecque J, Grenier D. 2009. Cytoprotective effect of proanthocyanidin-rich cranberry fraction against bacterial cell wall-mediated toxicity in macrophages and epithelial cells. *Phytother Res* 23: 1449-1452.
16. Kim MJ, Ohn J, Kim JH, Kwak HK. 2011. Effects of freeze-dried cranberry powder on serum lipids and inflammatory markers in lipopolysaccharide treated rats fed an atherogenic diet. *Nutr Res Pract* 5: 404-411.
17. Lacombe A, Wu VC, Tyler S, Edwards K. 2010. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* 139: 102-107.
18. Kalt W, MacKinnon S, McDonald JE, Vinqvist M, Craft CA, Howell A. 2008. Phenolics of *Vaccinium* berries and other fruit crops. *J Sci Food Agric* 88: 68-76.
19. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
20. Lai YS, Hsu WH, Huang JJ, Wu SC. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide- and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages. *Food Funct* 3: 1294-1301.
21. Jung H, Kwak HK, Hwang KT. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory activities of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside in hydrogen peroxide and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells. *Food Sci Biotechnol* 23: 2053-2062.
22. Yen GC, Lai HH, Chou HY. 2001. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chem* 74: 471-478.
23. Sangha V. 2012. Proanthocyanidin-rich cranberry-fraction-induced alteration of periodontal pathogen lipopolysaccharide functions. *MS Thesis*. The University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.
24. Kim MJ, Chung JY, Kim JH, Kwak HK. 2013. Effects of cranberry powder on biomarkers of oxidative stress and glucose control in *db/db* mice. *Nutr Res Pract* 7: 430-438.