

치자 에틸아세테이트 분획의 산화방지, 산화질소 제거 및 암세포증식 억제 활성

박민경¹ · 윤혜지¹ · 이화진^{1,*}
¹세명대학교 자연약재과학과

Antioxidant effect and inhibitory activities of ethyl acetate fraction from *Gardenia jasminoides* extract on nitric oxide production and pancreatic cancer cell proliferation

Min Kyung Park¹, Hye Ji Yoon¹, and Hwa Jin Lee^{1,*}

¹Department of Natural Medicine Resources, Semyung University

Abstract To evaluate the radical scavenging activity of phenolic-rich fractions of *Gardenia jasminoides*, we first measured the levels of total polyphenols in hexane, ethyl acetate, and butanol fractions from the extract of *G. jasminoides*. The ethyl acetate fraction of *G. jasminoides* extract (GJ-EA) showed high level of phenolics, potent reducing power, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl/2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical scavenging effect. In addition, GJ-EA inhibited the overproduction of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated BV-2 microglia. Furthermore, we found that GJ-EA suppressed H₂O₂-induced PANC-1 pancreatic cancer cell proliferation in a concentration-dependent manner and also reduced their migratory ability. These results suggest that GJ-EA may be a good source for functional foods with antioxidant and chemo-preventive activities.

Keywords: *Gardenia jasminoides*, antioxidant activity, radical scavenging, pancreatic cancer, tumor-migration

서 론

인체 내에서 산소는 생명유지를 위한 호흡과 에너지 생산과정 에 중요한 작용을 하지만, 그 일부는 환경오염, 음주, 흡연, 화학 약품과 산화적 스트레스에 의해 활성 산소종(ROS, reactive oxygen species)과 활성 질소종(RNS, reactive nitrogen species)을 생성한다. 활성 산소종에는 과산화물 음이온 라디칼, 하이드록실 자유 라디칼(hydroxyl free radicals)과 비자유 라디칼(non-free radical)인 과산화수소(H₂O₂) 등이 있으며, 활성 질소종에는 산화질소(nitric oxide, NO)와 과산화 질산 음이온(peroxynitrite, ONOO⁻) 등이 알려져 있다(Lee 등, 2016; Poprac 등, 2017). 자유 라디칼 반응에 의해 생성되는 활성 산소종과 활성 질소종은 구조적으로 매우 불안정하여 주위 세포들과 반응하여 단백질의 불활성화와 조직의 손상, 그리고 유전자 변이 등을 유발하여 노화, 퇴행성 신경질환, 대사증후군과 종양 같은 질환의 주요 원인으로 보고되고 있다 (Islam, 2017; Kundu 등, 2012; Liu 등, 2017; Yang 등, 2017). 특히 과도한 활성 산소종의 생성으로 인해 정상 세포의 손상을 초래하는 동시에 종양의 생성을 촉진하고(Gupta 등, 2014), 저농

도의 과산화수소에서 위암 발병이 촉진되는 등 과산화수소의 농도에 따라 종양의 생성과 진행에 영향을 미치는 연구결과가 보고되었다(Wang 등, 2017).

산화방지제(antioxidant)는 자유 라디칼에 의한 산화적 스트레스를 완화시키거나 자유 라디칼을 제거하는 물질로서, 생체 내에는 초과산화물 제거효소(superoxide dismutase), 카탈레이스(catalase), 과산화물(peroxide) 등과 같은 산화방지 효소와 바이타민 C, 바이타민 E, 글루타싸이온 등과 같은 산화방지 물질이 존재하고 있으나 활성 산소종의 생성과 방어 시스템 사이의 불균형이 발생하면 생체 내 분자들의 산화를 초래한다. 최근 산화방지제 소재들이 지속적으로 개발되고 있으나 산화방지 효소는 단백질로 구성되어 있어 온도와 pH에 영향을 받을 수 있고, 합성 산화방지제는 변이원성이 제시되면서 천연물로부터 산화방지 기능성 생리활성 물질에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Castaneda 등, 2017; Danta과 Piplani, 2014; Losada-Barreiro과 Bravo-Diaz, 2017).

치자(*Gardenia Fructus*)는 치자나무(*Gardenia jasminoides*, 꼭두서닛과 Rubiaceae)의 열매로 염증, 황달, 간 장애의 치료 목적과 자연 염색재료로서 사용되었으며(Liu 등, 2013), 치자의 황금색 색소는 주스, 젤리, 사탕, 국수 등의 식용색소로서 오랜 기간 한국, 일본과 중국에서 사용해 왔다(Watanabe과 Terabe, 2000). 치자의 생리활성으로 항당뇨(Wu 등, 2009), 항염증(Xu 등, 2017), 혈압강하(Chen 등, 2017), 산화방지 활성(Xiao 등, 2017)과 기억력 개선(Zhang 등, 2017)에 대한 연구들이 보고되고 있으며, 치자의 성분으로는 제니포사이드(geniposide), 제니포시드산(geniposidic acid), 제니핀(genipin), 가테노사이드(gardenoside)와 가도사이드

*Corresponding author: Hwa Jin Lee, Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon, Chungbuk 27136, Korea
Tel: +82-43-649-1682
Fax: +82-43-649-1729
E-mail: hwalee@semyung.ac.kr
Received November 16, 2017; revised January 4, 2018;
accepted January 11, 2018

(gardoside) 등의 이리도이드(iridoid) 화합물(Chang 등, 2005; Wang 등, 2016), 바닐산 유도체(Kim 등, 2006; Yu 등, 2012)와 카로테노이드(carotenoid) 화합물(Chen 등, 2008a; Peng 등, 2013; Wang 등, 2015) 등이 알려져 있다. 주성분인 제니포사이드와 그의 인글리콜(aglycone)인 제니핀은 lipopolysaccharide로 유도된 염증모델에서 염증반응을 저해하고(Fu 등, 2012), 고지방식으로 유도된 당뇨병 모델에서 간 글리코겐 인산첨가분해효소의 발현을 억제하여 혈당강하효과를 나타내고(Wu 등, 2009), 항혈전 효과(Suzuki 등, 2001)와 간세포보호 효과(Kim 등, 2010) 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 치자의 주요 카로테노이드 화합물인 크로신(crocin)류와 크로세틴(crocetin) 등은 산화방지 활성을 통한 간세포보호 효과(Gedik 등, 2017), 암세포의 증식억제와 염증성 사이토카인의 생성억제 효과(Oliveira 등, 2017)를 나타내는 것으로 보고되었다. 한편, 친수성 식용색소이자 강력한 산화방지 활성을 가진 것으로 알려진 크로신과 크로세틴은 치자 추출물보다 DPPH 라디칼 제거활성이 강하지 않고, 크로신의 함량과 산화방지 활성이 연관성이 없다는 것이 보고되기도 하였다(Chen 등, 2008b; Chen 등, 2010). 치자의 물추출물과 주요성분인 제니포사이드와 크로신에 대한 생리활성 연구는 다양하게 이루어지고 있으나, 치자의 페놀성 물질에 대한 활성연구는 아직 미미한 상태이다. 따라서, 본 연구에서는 치자의 폴리페놀 다량 함유 분획을 이용하여 라디칼 제거활성과 과산화수소로 유도된 암세포의 증식과 이동성에 미치는 영향을 평가하고 치자 폴리페놀 다량 함유 분획의 산화방지 기능성 식품소재를 위한 기초자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료의 추출과 분획

실험재료인 치자는 2014년 6월 충북 제천의 제천한방약초물(Jecheon, Korea)에서 구입하였고, 산지는 전남 진도산으로 확인하였다. 치자 900 g을 9L의 70% 에탄올로 3시간 동안 상온에서 초음파추출, 여과한 후 감압농축과 냉동건조를 통해 치자 에탄올 추출물(GJE, 145 g)을 얻었다. 이후 에탄올 추출물 100 g에 1L 증류수를 가한 후, 동량의 헥세인(n-hexane), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 그리고 뷰탄올(n-butanol) 순으로 극성에 따른 용매분획을 실시하여 헥세인 분획(GJ-H, 9.1 g), 에틸아세테이트 분획(GJ-EA, 8.3 g)과 뷰탄올 분획(GJ-Bu, 13.4 g)을 얻어 이후 실험에 사용하였다.

시약과 기기

폴린-시오칼토의 페놀시약(Folin-Ciocalteu's phenol reagent), 갈산(gallic acid), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 페리시아안화포타슘(potassium ferricyanide), 염화철(III) (ferric chloride), 탄산소듐(sodium carbonate), 다이메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)는 Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 추출용 에탄올(ethanol, reagent grade)과 에틸아세테이트(ethyl acetate, reagent grade)는 Duksan Pure Chemicals Co. Ltd. (Ansan, Korea)에서 구입하였다.

세포주 배양과 시료의 처리

BV-2 미세아교세포(microglia)와 PANC-1 췌장암 세포주(ATCC, Rockville, MD, USA)를 각각 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 100 mg/mL의 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin) (Life Technologies, Frederick, MD, USA)이 포함된 DMEM 배지로 37°C, 5% 이산화탄소 배양기(CO₂ incubator)에서

배양하였다. 시료는 DMSO에 용해시켜 보관하고, 세포에 시료를 가할 때 DMSO의 농도가 0.1% 이하가 되도록 처리하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

치자 추출물과 각 분획의 총 폴리페놀성 화합물의 함량은 포스포몰리브덴산(phosphomolybdic acid)과 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용한 폴린-데니스(Folin-Denis)법을 변형하여 측정하였다(Padda과 Picha, 2007). 추출물 100 mL과 각 분획을 50 mL의 폴린-시오칼토의 페놀시약과 혼합하고 25°C에서 5분간 방치한 후, 300 mL의 20% 탄산소듐 용액을 가하고 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 표준 보정선은 갈산(gallic acid, GA)을 이용하여 시료와 동일한 방법으로 반응시켜 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물과 각 분획의 총 폴리페놀 함량은 갈산의 당량가로(mg GAE/g)으로 표시하였다.

염화제이철/염화철(III) 정색반응

페놀류와 철 이온과의 착이온 형성을 통한 정색반응을 확인하기 위해 치자 추출물과 각 분획에 대해 염화제이철/염화철(III) 정색반응을 실시하였다. 치자 추출물과 각 분획(10 mg/mL) 500 µL에 10% 염화제이철/염화철(III) 액 2-3방울을 가하여 암녹색~청색의 정색 여부를 관찰하고, 이를 통해 페놀류 구조를 가진 물질의 존재유무를 확인하였다.

환원력 측정

다양한 농도의 치자 에틸아세테이트 분획 200 µL에 0.2 M 인산완충용액 200 µL과 1% 페리시아안화포타슘 200 µL를 가하여 혼합한 후 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 10% TCA 용액 200 µL을 가하여, 4000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 30 µL에 0.1% 염화철(III) 150 µL을 가하여 혼합한 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼 제거활성

DPPH 라디칼이 라디칼 제거물질과 반응하여 안정한 형태의 화합물로 전환되면서 정량적으로 탈색되어 진한 보라색에서 옅은 노란색으로 변하는 원리를 이용한 방법이다(Jasprica 등, 2007). 여러 농도의 치자 에틸아세테이트 분획 100 µL에 에탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 라디칼 용액 100 µL을 가하여 상온에서 30분 반응시킨 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 희석 시 사용한 용매를 시료와 같은 방법으로 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 계산식, DPPH 라디칼 제거활성(%)=[(O.D. of control-O.D. of sample)/O.D. of control]×100에 의해 활성을 산출하였다. 또한 50% DPPH 라디칼 제거활성을 나타내는 시료의 농도(SC₅₀)를 구하여 시료의 라디칼 제거활성 정도를 평가하였다.

ABTS 라디칼 제거활성

2,2'-Azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma-Aldrich Co., USA) 라디칼 제거능은 ABTS radical cation decolorization assay (Re 등, 1999)를 이용하여 측정하였다. 7.4 mM의 ABTS와 2.6 mM 과황산포타슘을 혼합하여 실온·암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액을 732 nm에서 흡광도가 0.700±0.030이 되도록 인산완충 식염수(pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. DPPH 라디칼 제거능 측정 실험과 동일한 방법으로 추출된 시료 용액 50 µL에 ABTS 용액 950 µL를 첨가하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, ABTS 라디칼 제거활성

(%)=[1-(O.D. of sample/O.D. of control)]×100에 의하여 활성을 산출하였다. 또한 50% ABTS 라디칼 제거활성을 나타내는 시료의 농도(SC₅₀)을 구하여 시료의 라디칼 제거활성 정도를 평가하였다.

산화질소(Nitric oxide, NO) 생성량의 측정

산화질소는 2-3초의 짧은 수명을 가진 불안정한 물질로 대부분 아질산염 이온(NO₂⁻) 형태로 전환되므로 생성된 산화질소의 양은 아질산염 이온의 형태로 정량하였다. BV-2 미세아교세포를 1.5×10⁵ cells/mL로 하여 48-well plate에 300 µL씩 분주하여 12시간 동안 부착시키고 새로운 배지로 교환한 다음 LPS를 0.1 µg/mL이 되도록 가하였다. 시료는 최종농도 0.1% DMSO 용액이 되도록 LPS와 동시에 배양액에 가한 다음 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양하였다. 세포배양 상층액 100 µL와 그리스 시약(10% H₃PO₄, 2% sulfanilamide, 0.2% naphthylethylenediamine) 100 µL를 혼합하여 10분 동안 반응시키고 발색정도를 마이크로플레이트 판독기(VERSAmax tunable, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 검량선 작성을 위해 아질산소듐(NaNO₂)을 표준품으로 사용하였다. 또한 각 well의 배양액을 제거 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 2시간 처리하여 생성된 MTT 포마잔을 DMSO 용액에 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 세포에 대한 독성 정도를 평가하였다.

과산화수소 유도형 암세포의 생존 측정

PANC-1 세포를 2×10⁴ cells/mL 로 하여 96-well plate에 100 µL씩 분주하여 12시간 동안 부착시키고 새로운 배지로 교환한 다음 과산화수소를 가하였다. 시료는 최종농도 0.1% DMSO 용액이 되도록 과산화수소와 동시에 배양액에 가한 다음 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 48시간 배양하였다. 각 well의 배양액을 제거 후 인산완충식염수로 한 번 세척한 후, MTT 용액을 가하였다. 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 4시간 배양한 후, 생성된 MTT 포마잔을 DMSO 용액에 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화수소 유도형 암세포의 이동 측정

암세포의 이동 정도는 Ju 등(2012)이 보고한 상처치유분석법(wound healing assay)으로 측정하였다. 24-well plate에 PANC-1 세포를 분주(1×10⁴ cells/well)하여 12시간 동안 부착시키고 70-80%의 밀도가 되었을 때, 피펫팁(pipette tip)을 이용하여 평행한 줄을 긋아서 세포가 없는 빈 공간(wound)을 만들었다. 이어 과산화수소와 치자 에틸아세테이트 분획 시료(50과 150 µg/mL)를 처리한 후, 24시간 후 동일한 영역에서 세포가 빈 공간(wound)으로 이동된 정도를 관찰하였다.

통계 처리

실험결과에서 얻은 모든 값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균±표준편차로 표시하였다. 각 평균치에 대한 검증은 SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, Student's t-test 또는 일원배치분산분석(one-way ANOVA)와 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 p<0.05인 값에 대해 유의적인 것으로 처리하였다.

Table 1. Content of total polyphenols and FeCl₃ reaction in *Gardenia jasminoides*

Samples	Total polyphenols (mg GAE ¹⁾ /g)	FeCl ₃ reaction
GJE ²⁾	38.5±0.8	+ ⁶⁾
GJ-H ³⁾	8.8±0.1	- ⁷⁾
GJ-EA ⁴⁾	133.7±5.3	++
GJ-Bu ⁵⁾	27.4±1.7	-/+

¹⁾Gallic acid equivalent
²⁾GJE: 70% ethanol extract of *Gardenia jasminoides*
³⁾GJ-H: hexane fraction from 70% ethanol extract of *G. jasminoides*
⁴⁾GJ-EA: ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of *G. jasminoides*
⁵⁾GJ-Bu: butanol fraction from 70% ethanol extract of *G. jasminoides*
⁶⁾+: positive reaction; -/+ (very low) ~ ++ (high) mean the relative intensity
⁷⁾-: negative reaction

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량

산화성 스트레스와 노화성 만성질환의 예방에도 기여가 높은 것으로 알려진 식물유래의 폴리페놀은 산화방지 활성을 비롯한 다양한 생물학적 활성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Manach 등, 2005; Quideau 등, 2011). 따라서 치자 추출물과 각 분획에 함유된 총 폴리페놀의 함량을 측정함으로써 산화방지 활성이 강한 페놀성 분획을 찾고자 하였다. 치자의 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)에서 갈산으로 환산한(gallic acid equivalent, GAE) 폴리페놀 함량이 134 mg/g인 반면, 헥세인(GJ-H)과 부탄올(GJ-Bu) 분획은 각각 9 mg/g와 27 mg/g으로 측정되어 치자의 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)이 다량의 폴리페놀을 함유하는 페놀성 분획임을 확인하였다(Table 1). Dehnath 등(2011)은 치자 물추출물과 에탄올 추출물이 각각 53.5 mg GAE/100 g와 44.8 mg GAE/100 g의 폴리페놀을 함유하는 것으로 보고하였는데, 본 연구의 치자 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량(38.5 mg GAE/g)과의 차이는 온도와 추출 시간 등과 같은 추출조건에 따라 추출 성분의 종류와 함량이 달라지는 것으로 생각된다. 또한 염화제이철/염화철(III)(FeCl₃) 정색 반응에서 치자의 에틸아세테이트 분획이 염화제이철/염화철(III) 시액과 반응하여 진한 암녹색을 나타내는 것을 확인함으로써 페놀 구조의 화합물이 다량 존재함을 확인하였다. 이는 치자의 에틸아세테이트 분획에서 바닐산 유도체들이 분리되었다는 보고와도 일치함을 알 수 있다(Kim 등, 2006). 따라서 다량의 폴리페놀을 함유하는 치자의 에틸아세테이트분획에 대해 환원력, DPPH/ABTS 라디칼 제거활성, 미세아교세포와 과산화수소로 유도된 체장암 세포의 증식 및 이동성에 대한 저해효과를 확인하기로 하였다.

치자 에틸아세테이트 분획의 환원력과 라디칼 제거효과

산화방지 활성을 검정하는 방법으로, 금속이온을 환원시키는 효과가 강할수록 녹색에 가깝게 발색되어 높은 흡광도를 나타내는 방법을 실시하였다. 치자의 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)의 농도가 증가함에 따라 높은 흡광도를 나타내는 것을 확인할 수 있으며 특히, 25 µg/mL의 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)은 0.59의 흡광도를 나타내어 흡광도 0.62의 양성 대조군 아스코르브산(L-ascorbic acid, 50 µM)과 유사한 정도의 환원력을 나타내었다(Fig. 1A). 또한 DPPH와 ABTS 라디칼 제거법을 이용하여 치자 에틸

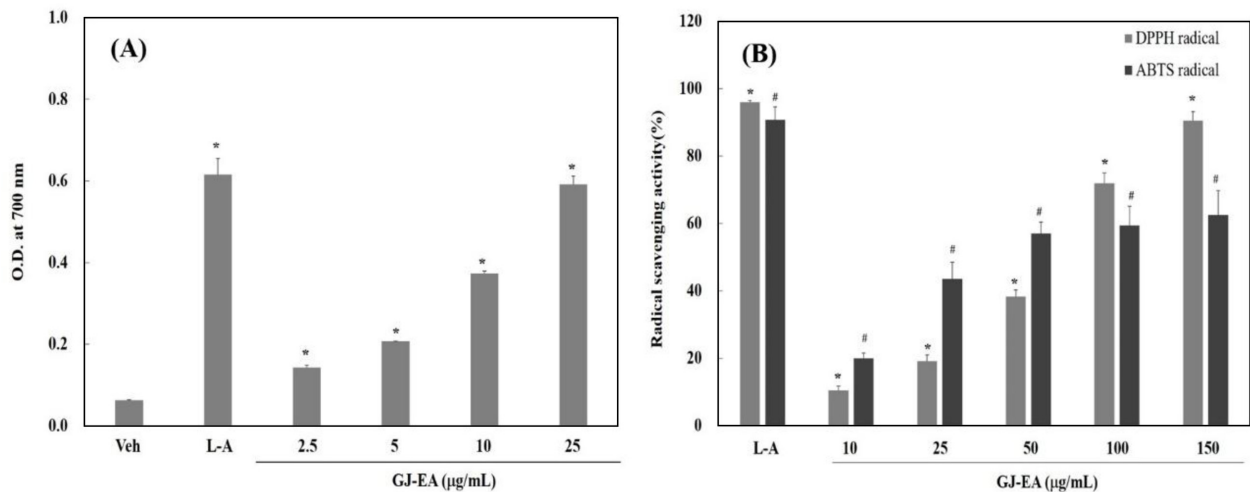


Fig. 1. Reducing power and radical scavenging activity of ethyl acetate fraction (GJ-EA) of *Gardenia jasminoides*. (A) Reducing power of ethyl acetate fraction (GJ-EA) of *G. jasminoides*. L-ascorbic acid (L-A, 50 μM) was used as a positive control for measuring of reducing power. (B) DPPH and ABTS radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fraction (GJ-EA) of *G. jasminoides*. L-ascorbic acid (L-A, 200 μM) is a positive control for radical scavenging. Radical scavenging activity (%) was measured as described in Materials and Methods. The values are expressed as the means±SD of three individual experiments. *[#]*p*<0.05 vs vehicle control.

아세트에이트 분획(GJ-EA)의 라디칼 제거 활성을 평가하여 산화방지 능력을 확인하였다. Fig. 1B에서 나타난 것처럼, 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 제거 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있으며, 양성 대조군인 아스코르브산(200 μM)의 DPPH 라디칼 제거력이 96.1%일 때, 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA) 150 μg/mL이 90.5%의 제거활성을 나타냄으로써 치자의 에틸아세테이트 분획의 강력한 DPPH 자유라디칼 제거활성을 확인하였다. 또한 ABTS 라디칼 제거활성평가에서도 같은 경향성을 관찰하였으며(Fig. 1B), 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA) 150 μg/mL에서 62.5%의 ABTS 자유라디칼 제거활성을 확인하였다. 활성 정도를 50% 라디칼 제거활성을 나타내는 농도(SC₅₀)로 나타내었을 때, DPPH와 ABTS 라디칼 제거에 대해 SC₅₀이 각각 50.6 μg/mL와 51.3 μg/mL이었다. 치자 에틸아세테이트 분획의 고농도(100-150 μg/mL)에서는 DPPH 자유라디칼 제거능력이 ABTS 자유라디칼 소거활성보다 우세한 경향을 나타내었지만, 저농도(10-50 μg/mL)에서는 ABTS 자유라디칼 제거활성이 우세함을 확인하였다. 따라서 페놀성분이 다량 분포하는 치자 에틸아세테이트 분획의 우수한 라디칼 제거 및 환원력을 확인함으로써 강력한 산화방지 효과를 기대할 수 있다.

치자 에틸아세테이트 분획의 LPS 유도형 산화질소(NO) 생성 억제활성

강력한 라디칼 제거 활성을 나타내는 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)에 대해 세포에서 발생하는 라디칼 생성에는 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. LPS로 처리한 BV-2 미세아교세포에서 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)의 산화질소(NO) 생성정도를 평가한 결과, LPS 단독처리군에 비해 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)은 농도 의존적으로 산화질소 생성 억제활성을 나타내었다(Fig. 2). 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA) 100과 150 μg/mL에서 각각 70%와 93%의 산화질소 생성 억제활성을 나타내었고, 이때 BV-2 미세아교세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다. 특히, LPS 처리군은 과량의 산화질소 생성으로 세포 생존율이 LPS 무처리군의 세포생존율에 비해 유의적으로 감소하였지만, 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA) 처리군에서는 그 농도가 증가함에

따라 산화질소 생성은 억제되고 세포 생존율은 회복되는 경향을 보여줌으로써 과량의 산화질소 생성에 의한 세포손상을 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)이 방지할 수 있음을 추정할 수 있다. Shon 등(2012)은 LPS로 자극시킨 큰 포식세포주에서 치자 추출물이 전사인자인 nuclear factor-κB (NF-κB)의 활성을 억제하여 과량의 산화질소 생성 억제효과를 나타냄을 보고하였고, 특히 글리코사이드를 다량 포함하는 추출물보다는 베타글루코사이드 가수분해 효소(β-glucosidase)처리를 통한 인글리콜 함유 추출물이 강력한 산화질소 생성 억제효과를 나타냄을 보고하였다. 따라서 본 연구결과에서 나타난 산화질소 생성 억제효과는 치자 에틸아세테이트 분획이 라디칼 제거뿐 아니라 염증환경에서 다양한 신호전달기전에도 영향을 줌으로써 발생하는 결과일 수 있음을 예측할 수 있다.

치자 에틸아세테이트 분획의 과산화수소 유도형 암세포 증식과 암세포 이동 억제 활성

활성 산소종의 일종인 과산화수소는 체내에 내재하는 산화물로 저농도에서는 세포내 그리고 세포간 신호를 전달하는 것에 관여한다고 알려져 있다(Carey 등, 2015). 특히, 과산화수소가 DNA 손상 회복, 유전체의 안정성과 단백질과 같은 고분자들의 활성을 억제함으로써 종양의 생성과 성장에 많은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Almasalmeh 등, 2014; Hara-Chikuma 등, 2016). Wang 등(2017)은 저농도의 과산화수소에 의해 위암세포의 증식이 촉진됨을 제시하였고, Cao 등(2016)은 과산화수소에 의해 췌장암 세포의 증식이 촉진될 뿐 아니라, 췌장암 세포의 전이와 이동성이 증가함을 확인하였고, 이에 대해 강황의 주요 페놀성 성분인 퀘르세틴이 억제효과를 나타냄을 제시한 바 있다. 따라서, 본 연구에서는 라디칼 제거활성과 산화질소 생성억제활성을 나타내는 치자의 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)이 활성산소종의 하나인 과산화수소에 의한 증가된 암세포 증식과 이동성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 먼저, PANC-1 췌장암 세포주에 대해 과산화수소를 농도별로 48시간 처리 후 암세포의 생존율을 MTT로 평가한 결과, 1 μM 과산화수소 처리군이 과산화수소 비처리군에 비해 16% 생존율이 증가하였으나, 200 μM 과산화수소

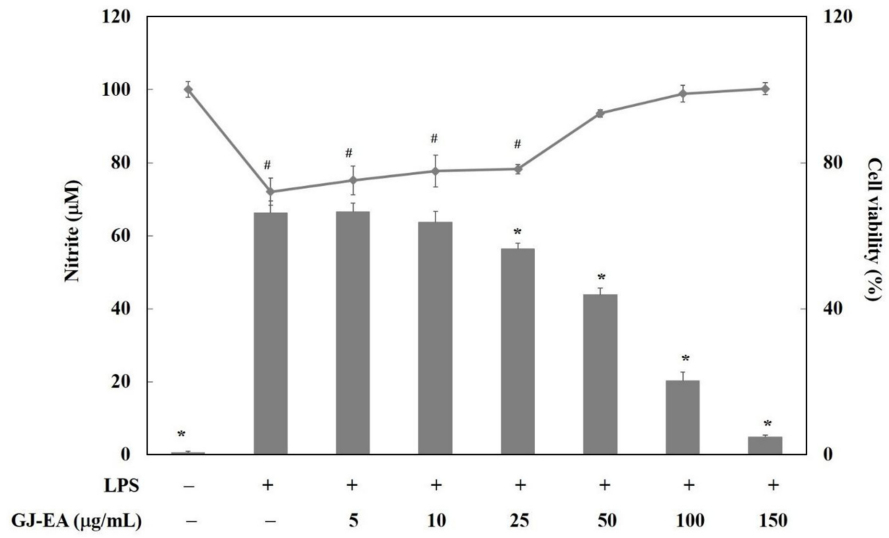


Fig. 2. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction (GJ-EA) of *Gardenia jasminoides* on NO production in LPS-activated BV-2 microglia. BV-2 cells were treated with LPS (0.1 µg/mL) and/or GJ-P for 24 h, and the amount of nitrite in supernatant was measured using Griess reagent (bar). Cell viability was determined by MTT assay (●). The values are expressed as the means±SD of three individual experiments. *[#]*p*<0.05 vs LPS control.

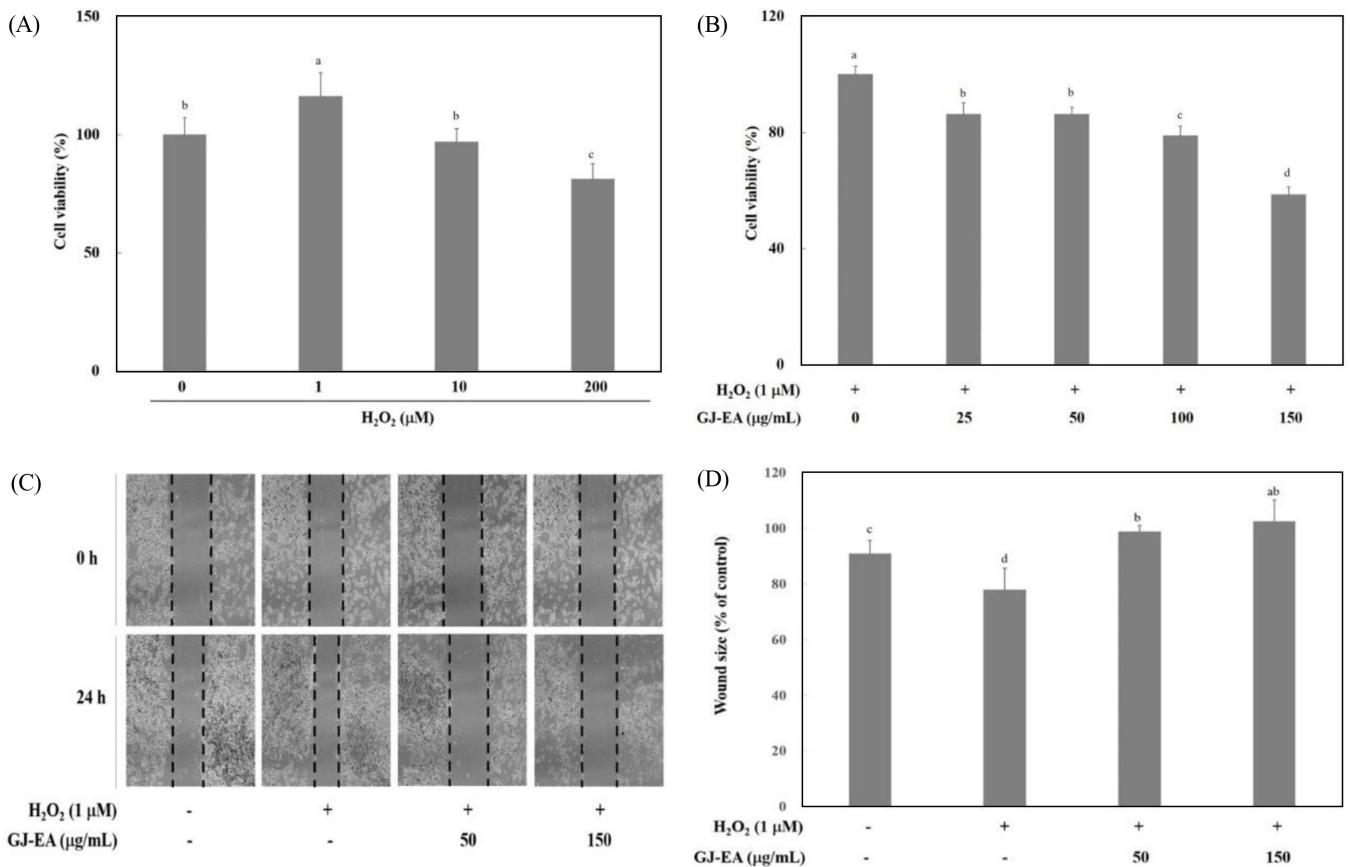


Fig. 3. Effect of ethyl acetate fraction (GJ-EA) of *Gardenia jasminoides* on viability and migration of H₂O₂ treated PANC-1 pancreatic cancer cells. (A) Cell viability of PANC-1 pancreatic cancer cells by H₂O₂ treatment. (B) Cell viability of H₂O₂ treated PANC-1 pancreatic cancer cells by ethyl acetate fraction (GJ-EA) of *G. jasminoides*. Letters above bars indicate significant differences (*p*<0.05). (C) Effect of ethyl acetate fraction (GJ-EA) of *Gardenia jasminoides* on migration of H₂O₂-treated PANC-1 pancreatic cancer cells. Images are representative wound areas for three independent experiments that show similar results. The wound size of 0 h was used as the control. Letters above bars indicate significant differences (*p*<0.05).

처리군은 20% 감소하였고, 10 μM 과산화수소 처리군은 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 이후, 1 μM 과산화수소 처리한 PANC-1 세포의 생존율에 대한 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)의 영향을 조사한 결과, 농도의존적으로 PANC-1 세포의 생존율이 감소됨을 확인하였고 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)에서는 PANC-1세포의 생존율이 1 μM 과산화수소 단독 처리군에 비해 42% 감소하였다(Fig. 3B). 따라서, 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)이 과산화수소로 촉진된 암세포의 증식에 대해 억제효과를 나타냄을 확인하였다. Lim 등(2010)의 보고에 의하면, 치자의 에틸아세테이트 분획은 구강암에 대해 암세포 증식억제효과를 나타내지 않았으나, 치자의 다이클로로메테인 분획이 DNA 국소이성질화효소(topoisomerase) 1 억제를 통한 구강암 세포의 증식억제효과가 있음을 제시하였다. 이는 암세포의 종류와 치자 분획별 성분 분포의 차이에 기인한 것으로 생각되며, 활성을 나타내는 분획의 성분에 대한 후속 연구가 필요한 것으로 사료된다.

암세포는 정상세포 혹은 양성 종양세포와는 달리 주변 조직으로 침윤하여 전이하는 특성을 가진다. 암세포의 처음 위치로부터 림프관이나 모세혈관을 통하여 주변의 조직으로 침투하고, 새로운 조직에 침입한 암세포는 증식하여 군집을 형성하여 전이가 이루어진다(Scheel과 Weinberg, 2012). 이때 암세포의 침윤과 전이 과정 중 필수 불가결한 부분이 이동성이다. 선행연구로 치자 추출물의 성분인 이리도이드 구조의 제니핀이 유방암의 세포사멸을 촉진하고 암세포이동과 침윤을 억제한다고 보고된 바 있다(Kim 등, 2012). 본 연구에서는 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)의 암세포 이동성 억제활성을 상처치유 분석법을 이용하여 측정하였다. Fig. 3C에서 보는 바와 같이, 24시간 이후 과산화수소 비처리와 처리군의 PANC-1 횡장암 세포의 이동성이 증가하여 상처 크기가 각각 10% 및 22% 감소하였다. 이는 Cao 등(2016)이 과산화수소 유도형 PANC-1 과 BxPC-3 횡장암 세포의 p-ERK 및 p-NF κ B 증가에 의해 암세포의 침윤과 이동성이 증가한다는 연구와 일치되는 경향을 나타낸다. 또한 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA) 처리군(50과 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 상처크기 감소가 거의 나타나지 않았다. 따라서 과산화수소 유도형 PANC-1 횡장암 세포 이동성 증가에 대해 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)이 억제효과가 있음을 확인하였다.

요 약

치자 추출물의 극성에 따른 분획-헤세인, 에틸아세테이트와 뷰탄올 분획의 폴리페놀 함량을 평가한 결과, 에틸아세테이트 분획이 다량의 폴리페놀을 함유함을 하였고, DPPH와 ABTS 라디칼 제거와 환원력 실험에서 강력한 라디칼 제거와 환원능력을 나타냈다. 또한 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)의 라디칼 제거 활성을 세포수준에서 평가한 결과, LPS로 활성화된 BV-2 미세아교세포에서 발생하는 과량의 산화질소 생성을 억제하였고, 과산화수소를 처리한 횡장암 세포주의 증식과 이동성에 대해 억제효과를 나타내었다. 따라서 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)이 라디칼 제거효과, 과산화수소 유도형 암세포의 증식과 이동성에 대한 억제효과를 가진다는 것을 확인하여 치자 에틸아세테이트 분획(GJ-EA)을 이용한 기능성 식품소재 개발을 위한 기초자료로 활용될 수 있음을 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

References

- Almasalmeh A, Krenc D, Wu B, Beitz E. Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *FEBS J.* 281: 647-656 (2014)
- Cao L, Liu J, Zhang L, Xiao X, Li W. Curcumin inhibits H₂O₂-induced invasion and migration of human pancreatic cancer via suppression of the ERK/NF- κ B pathway. *Oncol. Rep.* 36: 2245-2251 (2016)
- Carey GB, Roy SK, Daino H. The natural tumoricide Manumycin-A targets protein phosphatase 1 α and reduces hydrogen peroxide to induce lymphoma apoptosis. *Exp. Cell Res.* 332: 136-145 (2015)
- Castaneda OA, Lee SC, Ho CT, Huang TC. Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. *J. Food Drug Anal.* 25: 111-118 (2017)
- Chang WL, Wang HY, Shi LS, Lai JH, Lin HC. Immunosuppressive iridoids from the fruits of *Gardenia jasminoides*. *J. Nat. Prod.* 68: 1683-1685 (2005)
- Chen Y, Cai L, Zhao C, Xu HC, Cao CY, Liu Y, Jia L, Yin HX, Chen C, Zhang H. Spectroscopic, stability and radical-scavenging properties of a novel pigment from gardenia. *Food Chem.* 109: 269-277 (2008a)
- Chen S, Sun P, Zhao X, Yi R, Qian J, Shi Y, Wang R. *Gardenia jasminoides* has therapeutic effects on L-NNA-induced hypertension *in vivo*. *Mol. Med. Rep.* 15: 4360-4373 (2017)
- Chen Y, Zhang H, Li YX, Cai L, Huang J, Zhao C, Jia L, Buchanan R, Yang T, Jiang LJ. Crocin and geniposide profiles and radical scavenging activity of gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) from different cultivars and at the various stages of maturation. *Fitoterapia* 81: 269-273 (2010)
- Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, Jia L, Yin HX, Chen C. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chem.* 109: 484-492 (2008b)
- Danta CC, Piplani P. The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Drug Dis.* 9: 1205-1222 (2014)
- Debnath T, Park PJ, Debnath NC, Samad NB, Park HW, Lim BO. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. *Food Chem.* 128: 697-703 (2011)
- Fu Y, Liu B, Liu J, Liu Z, Liang D, Li F, Li D, Cao Y, Zhang X, Zhang N, Yang Z. Geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models. *Int. Immunopharmacol.* 14: 792-798 (2012)
- Gedik S, Erdemli ME, Gul M, Yigitcan B, Gozukara Bag H, Aksungur Z, Altinoz E. Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alterations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats. *Biomed. Pharmacother.* 95: 764-770 (2017)
- Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pac. J. Cancer P.* 15: 4405-4409 (2014)
- Hara-Chikuma M, Watanabe S, Satooka H. Involvement of aquaporin-3 in epidermal growth factor receptor signaling via hydrogen peroxide transport in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 471: 603-609 (2016)
- Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked

- neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* 39: 73-82 (2017)
- Jasprica I, Bojic M, Mornar A, Besic E, Bucan K, Medic-Saric M. Evaluation of antioxidative activity of Croatian propolis samples using DPPH* and ABTS*+ stable free radical assays. *Molecules* 12: 1006-1021 (2007)
- Ju J, Kwak Y, Hao X, Yang CS. Inhibitory effects of calcium against intestinal cancer in human colon cancer cells and Apc(Min/+) mice. *Nutr. Res. Pract.* 6: 396-404 (2012)
- Kim ES, Jeong CS, Moon A. Genipin, a constituent of *Gardenia jasminoides* Ellis, induces apoptosis and inhibits invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 27: 567-572 (2012)
- Kim SJ, Kim JK, Lee DU, Kwak JH, Lee SM. Genipin protects lipopolysaccharide-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice. *Eur. J. Pharmacol.* 635: 188-193 (2010)
- Kim HJ, Kim EJ, Seo SH, Shin CG, Jin C, Lee YS. Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from *Gardenia fructus*. *J. Nat. Prod.* 69: 600-603 (2006)
- Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Free Radical Res.* 46: 1482-1489 (2012)
- Lee CT, Yu LE, Wang JY. Nitroxide antioxidant as a potential strategy to attenuate the oxidative/nitrosative stress induced by hydrogen peroxide plus nitric oxide in cultured neurons. *Nitric Oxide* 54: 38-50 (2016)
- Lim W, Kim O, Jung J, Ko Y, Ha J, Oh H, Lim H, Kwon H, Kim I, Kim J, Kim M, Kim S, Kim BK, Kim S, Kang BC, Choi H, Kim O. Dichloromethane fraction from *Gardenia jasminoides*: DNA topoisomerase I inhibition and oral cancer cell death induction. *Pharm. Biol.* 48: 1354-1360 (2010)
- Liu H, Chen YF, Li F, Zhang HY. Fructus *Gardenia (Gardenia jasminoides)* J. Ellis phytochemistry, pharmacology of cardiovascular, and safety with the perspective of new drugs development. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 15: 94-110 (2013)
- Liu H, Liu X, Zhang C, Zhu H, Xu Q, Bu Y, Lei Y. Redox imbalance in the development of colorectal cancer. *J. Cancer.* 8: 1586-1597 (2017)
- Losada-Barreiro S, Bravo-Diaz C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 133: 379-402 (2017)
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 230S-242S (2005)
- Oliveira H, Cai X, Zhang Q, de Freitas V, Mateus N, He J, Fernandes I. Gastrointestinal absorption, antiproliferative and anti-inflammatory effect of the major carotenoids of *Gardenia jasminoides* Ellis on cancer cells. *Food Funct.* 8: 1672-1679 (2017)
- Padda MS, Picha DH. Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *J. Food Sci.* 72: C412-C416 (2007)
- Peng K, Yang L, Zhao S, Chen L, Zhao F, Qiu F. Chemical constituents from the fruit of *Gardenia jasminoides* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 1127-1131 (2013)
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38: 592-607 (2017)
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Edit.* 50: 586-621 (2011)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin. Cancer Biol.* 22: 396-403 (2012)
- Shon DH, Choi DW, Kim MH. Improvement of anti-inflammation activity of *Gardenia fructus* extract by the treatment of β -glucosidase. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 331-336 (2012)
- Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model. *Planta Med.* 67: 807-810 (2001)
- Wang Y, Chen Y, Deng L, Cai S, Liu J, Li W, Du L, Cui G, Xu X, Lu T, Chen P, Zhang H. Systematic separation and purification of iridoid glycosides and crocetin derivatives from *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography. *Phytochem. Analysis* 26: 202-208 (2015)
- Wang L, Liu S, Zhang X, Xing J, Liu Z, Song F. A strategy for identification and structural characterization of compounds from *Gardenia jasminoides* by integrating macroporous resin column chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion-mobility spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1452: 47-57 (2016)
- Wang Q, Shen W, Tao GQ, Sun J, Shi LP. Study on the proliferation of human gastric cancer cell AGS by activation of EGFR in H_2O_2 . *Eur. Rev. Med. Pharmacol.* 21: 1006-1012 (2017)
- Watanabe T, Terabe S. Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 880: 311-322 (2000)
- Wu SY, Wang GF, Liu ZQ, Rao JJ, Lu L, Xu W, Wu SG, Zhang JJ. Effect of geniposide, a hypoglycemic glucoside, on hepatic regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Acta Pharmacol. Sin.* 30: 202-208 (2009)
- Xiao W, Li S, Wang S, Ho CT. Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides*. *J. Food Drug Anal.* 25: 43-61 (2017)
- Xu B, Li YL, Xu M, Yu CC, Lian MQ, Tang ZY, Li CX, Lin Y. Geniposide ameliorates TNBS-induced experimental colitis in rats via reducing inflammatory cytokine release and restoring impaired intestinal barrier function. *Acta Pharmacol. Sin.* 38: 688-698 (2017)
- Yang X, Li Y, Li Y, Ren X, Zhang X, Hu D, Gao Y, Shang H. Oxidative stress-mediated atherosclerosis: mechanisms and therapies. *Front Physiol.* 8: 600 (2017)
- Yu Y, Feng XL, Gao H, Xie ZL, Dai Y, Huang XJ, Kurihara H, Ye WC, Zhong Y, Yao XS. Chemical constituents from the fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Fitoterapia* 83: 563-567 (2012)
- Zhang H, Lai Q, Li Y, Liu Y, Yang M. Learning and memory improvement and neuroprotection of *Gardenia jasminoides* (Fructus gardenia) extract on ischemic brain injury rats. *J. Ethnopharmacol.* 196: 225-235 (2017)