

알코올을 처리한 HepG2 세포에서 참죽나무 잎 추출물의 세포 보호 및 항산화 효과

김현정 · 조수연 · 김정봉* · 김현웅** · 최정숙* · †장환희***

농촌진흥청 국립농업과학원 연구원, *농촌진흥청 국립농업과학원 농업연구관
농촌진흥청 국립농업과학원 박사후연구원, *농촌진흥청 국립농업과학원 농업연구사

Effects of the *Cedrela sinensis* A. Juss. Leaves on the Alcohol-Induced Oxidative Stress in the Human Hepatic HepG2 Cells

Hyun-Jeong Kim, Su-Yeon Cho, Jung-Bong Kim*, Heon-Woong Kim**, Jeong-Sook Choe* and †Hwan-Hee Jang***

Researcher, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, South Korea

*Senior Researcher, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, South Korea

**Postdoctoral Researcher, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, South Korea

***Associate Researcher, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, South Korea

Abstract

All the parts of the *Cedrela sinensis* A. Juss., including the seeds, roots, and leaves, have been known to exert medicinal effects. The *C. sinensis* and its major compound, quercetin, were previously reported to exhibit the anti-inflammatory and anti-oxidative activities. However, the hepatoprotective effects of the *C. sinensis* leaves against the alcohol-induced oxidative stress in the HepG2 cells have not been studied. In this study, we investigated the antioxidant activities and analyzed the flavonoid contents of the *C. sinensis*-leaf extract (CE). The total flavonoid contents of the CE is 1,874.5 mg/100 g dry weight (DW), while the total quercetin 3-O-rhamnoside (quercitrin) contents, which was identified as the major flavonol in the CE, is 1,456.0 mg/100 g DW. In the ethanol-stimulated HepG2 cells, the CE effectively prevented the cytotoxic effect and increased the gene expression of the antioxidant enzymes, such as the heme oxygenase-1 (HO-1) and the glutathione peroxidase (GPx). The level of the reactive oxygen species (ROS) production was significantly decreased in the CE-treated HepG2 cells. In conclusion, the *C. sinensis* extract suppressed the alcohol-induced oxidative stress in the HepG2 cells via the induced GPx and HO-1 gene expressions. It is expected the CE positive effects will likely be attributed to the flavonoids, like the quercetin, within the CE.

Key words: *Cedrela sinensis* A. Juss., ethanol, hepatocyte, ROS, antioxidant

서론

참죽나무는 쥐손이풀목 멀구슬나무과에 속하는 낙엽교목으로 독특한 향이 나는 잎과 줄기는 향춘 또는 저항향으로, 순은 참죽이라 불리며, 아시아 지역에서 약용 및 식용으로 이용되어왔다. 씨앗, 뿌리껍질, 잎자루, 잎 등 모든 부분에 약용 효과가 있다고 알려진 참죽나무는 전통적으로 소염, 해독, 살

충의 효능이 있어 장염, 이질 개선 등의 치료에 이용되었다 (Park 등 1994). 현재 식품의 기준 및 규격(제2017-102호)에는 참죽나무의 순과 잎이 식품원료로서 사용이 가능한 부위로 등재되어 있다. 참죽나무 잎은 rutin, isoquercitrin, quercitrin, afzelin, luteolin, quercetin 등의 플라보노이드(flavonoids)를 포함하고 있다(Park 등 1993). 플라보노이드 중 플라보놀(flavonols)에 속하는 퀘르세틴(quercetin)은 과일, 채소 및 음료

† Corresponding author: Hwan-Hee Jang, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, South Korea. Tel: +82-63-238-3682, Fax: +82-63-238-3842, E-mail: rapture19@korea.kr

등에 광범위하게 존재하며, 다른 식물성 화합물에 비해 상대적으로 높은 생체 이용률을 나타낸다. 퀘르세틴은 항염증 및 항산화력을 통한 심혈관 질환 예방, 항암 효과 등의 생리활성을 가진 것으로 알려져 있다(Russo 등 2012; Kim 등 2017). 최근 참죽나무에 관한 연구로는 참죽나무 잎 추출물의 면역 증강 및 항균(Shin 등 2008), 항염증 및 진통효과(Park 등 1994), 새순 추출물의 항균 활성과 피부 보습 효과(Kim 등 2010) 등이 보고되었지만, 알코올성 간 손상에 대한 참죽나무 잎의 생리활성에 대한 연구는 진행된 바가 없다.

알코올에 의한 산화스트레스는 에탄올 대사와 관련이 있다. 지금까지 밝혀진 인체 내 에탄올 대사는 alcohol dehydrogenase, microsomal ethanol oxidation system(MEOS), catalase 효소를 포함하는 3가지 대사경로이다. 각각의 경shdudusrn로에서는 유해 부산물로 반응성 높은 자유 라디칼이 생성된다(Cederbaum AI 1990; Jung BS 1991; Kukielka 등 1994; Mantle & Preedy 1999; Das 등 2005). 생성된 반응성이 높은 자유 라디칼은 항산화 시스템을 저해하고, 산화 스트레스를 유발하며, 다양한 메커니즘을 통해 세포 손상을 유발한다(Koch 등 2004). 특히 에탄올에 의한 간세포의 산화 스트레스는 알코올성 간 질환 (ALD, alcoholic liver disease)의 발달에 핵심적인 역할을 한다(Sergent 등 2001; Wu & Cederbaum 2003).

따라서 본 연구에서는 UPLC-DAD-ESI-QToF/MS를 이용해 참죽나무 잎의 플라보노이드 성분을 정량분석하고, 에탄올을 이용해 인간 간암 세포주인 HepG2에 산화스트레스를 유도한 뒤 참죽나무 잎 추출물의 HepG2 세포 보호 효과와 항산화능을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 참죽나무 주정 추출물 제조

본 연구에 사용된 참죽나무(*Cedrela sinensis* A. Juss.)잎은 경상남도 남해에서 재배된 것을 농장에서 직접 구입하였다. 참죽나무 잎은 수세 후 동결건조(PVTFD 10R, Ilsin Lab, Yangju, Korea)하여 균일하게 분쇄하고, 시료 30 g에 중량 대비 20배의 70% 발효주정을 가하여 실온에서 160 rpm으로 19 시간동안 교반추출(Jeio tech sa-71, Lab companion, Daejeon, Korea)하였다. 추출물은 ADVANTEC paper(No. 6)(ADVANTEC Co., Tokyo, Japan)를 이용해 감압여과하고, 34°C에서 감압농축기(EYELA N-1000, Riakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축한 후 동결건조(PVTFD 10R, Ilsin Lab, Yangju, Korea)하여 시료로 사용하였다. 시험에 사용된 참죽나무 잎 추출물의 추출수율은 13.82%이고, 최종 추출수율은 생시료 기준 4.44%로 나타났다.

2. 참죽나무 잎의 플라보노이드(flavonoid) 추출 및 분석

참죽나무 잎의 플라보노이드 성분은 Kim 등(2017)과 동일한 방법으로 분석하였으며, 분석 방법은 다음과 같다. 참죽나무 동결건조 분말 시료 1 g을 50 mL conical tube에 넣은 후 내부 표준물질(galangin 20 ppm)이 포함된 추출 용매(methanol: water: formic acid=50: 45: 5, v/v/v) 10 mL를 넣고 진동혼합한 뒤 진탕 배양기를 이용하여 5분간 추출하였다. 혼합액을 원심분리(3,000 rpm, 15분, 10°C)하여 얻어진 상층액을 0.2 µm syringe filter(25 mm, Whatman International, Maidstone, Kent, UK)로 여과한 다음, 여과액 0.5 mL와 water 4.5 mL를 섞어 희석시켰다. 플라보노이드 성분의 정제는 Sep-pak C₁₈ classic cartridge(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, methanol 2 mL, water 2 mL 순으로 흘려주어 활성화 시킨 뒤 희석된 여과액 5 mL를 loading한 후 water 2 mL를 흘려 washing한 다음, methanol 3 mL로 흡착된 플라보노이드 성분을 용출하였다. 용출액 3 mL를 N₂ 가스로 완전히 날려 버린 후 0.5 mL의 내부 표준물질이 포함되지 않은 추출 용매로 재 용해하여 0.2 µm syringe filter(13 mm, Whatman)로 여과한 뒤 HPLC 분석용 vial에 담아 UPLC-DAD-ESI-QToF/MS로 분석하였다. 플라보노이드 분리 및 동정은 액체크로마토그래피(Waters ACQUITY UPLC™ system, Waters, Milford, MA, USA)와 연결된 Q-ToF 질량분석기(Xevo G2 QToF, Waters MS Technologies, Manchester, UK)를 사용하였다. UPLC 분석 시 C18 column(Kinetex 1.7 µ XB-C18 100A, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였으며, 컬럼 오븐온도는 30°C, 시료 주입량은 5 µL, 검출파장은 210~400 nm로 설정하였다. 이동상으로는 용매 A(water: formic acid: =99.5:0.5, v/v) 및 용매 B(acetonitrile: formic acid: =99.5:0.5, v/v)를 사용하였으며, 유량은 0.3 mL/min로 설정하였다. 용매 구배조건은 용매 B를 5%로 시작하여 20분까지 25%, 25분까지 50%, 30분까지 90%로 증가시킨 다음 32분까지 2분간 유지하다 35분까지 5%로 감소시키고 40분까지 유지하였다. 질량분석 조건은 ion source 온도 120°C, desolvation 온도는 500°C로 설정하였다. Desolvation 가스는 1,050 L/hr, cone 가스는 50 L/hr로 설정하였으며, capillary 전압은 3,500 V, sampling cone 전압은 40 V, extraction cone 전압은 4.0 V로 설정하였다. 질량 스캔 범위는 m/z 200~1,200으로 설정하였고, 모든 성분은 양이온 모드로 분석하였다. 검출 시간이 서로 근접한 peak의 경우, LC-MS에서 특정 이온의 분자량을 선택하여 검출하는 방법인 selected ion monitoring(SIM) mode를 사용하여 분석하였다. 검출된 개별 성분 동정은 선행 연구들의 UV spectrum, 단편이온패턴 데이터를 참고하여 수행되었다. 참죽나무 내 플라보노이드 개별 성분 정량은 내부표준 물질의 면적을 기준으로 계산되었으며, 동정된 각 화합물 간의 검출기 내 response factor는 고려하지 않았다.

3. 세포 배양

인간 간암세포주 HepG2 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. HepG2 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Rockville, IL, USA) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Rockville, IL, USA)과 1% penicillin-streptomycin solution(100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin; HyClone Laboratories Inc., South Logan, UT, USA)을 첨가한 배지를 사용하였다. 세포는 5% CO₂, 37°C 조건하에서 배양하였다.

4. 세포보호 효과

24 well plate에 HepG2 세포(cells/mL)를 24시간 배양한 후 참죽나무 잎 추출물(10, 50, 100 µg/mL) 또는 퀘르세틴(50 µM)을 처리하고 에탄올(500 mM) 첨가 배지로 교체하여 24시간 배양하였다. 세포 생존율은 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS; Promega, Madison, WI)를 이용해 측정하였다. 490 nm에서 흡광도를 측정하고, 측정 결과는 양성대조군(500 mM 에탄올 및 0.5% DMSO처리)의 세포 생존율이 100%가 되도록 계산하였다.

5. ROS 생성 억제능

세포 내 ROS 생성능은 형광물질인 DCFH-DA(D6883, Sigma)를 이용하여 확인하였다. HepG2세포(1×10^5 cells/mL)를 24 well plate에 24시간 배양한 뒤 참죽나무 잎 추출물(10, 50, 100 µg/mL) 또는 퀘르세틴(50 µM)을 처리하고, 에탄올(100 mM) 첨가 배지로 교체하였다. 24시간 배양 후 PBS(phosphate buffer saline)로 2회 세척한 뒤 DCFH-DA(50 µM)를 처리하여 37°C 암실에서 30분간 배양하였다. 다시 PBS로 2회 세척하여 남아 있는 DCFH-DA를 제거하고, 형광현미경(100×) 및 형광분광광도계(504 nm/524 nm, Hidex Oy, Turku, Finland)를 이용하여 DCF 형광발광정도를 측정하였다. 세포 내 ROS 생성능은 양성대조군(100 mM 에탄올 및 0.5% DMSO 처리)의 DCF형광 발광정도를 100%가 되도록 하여 비교분석하였다.

6. RT-PCR

6 well plate에 HepG2 세포(cells/mL)를 배양하고, 참죽나무 잎 추출물(10, 50, 100 µg/mL) 또는 퀘르세틴(50 µM)을 처리한 다음, 에탄올(100 mM) 첨가 배지로 교체하였다. 24시간 후 기존의 배지를 버리고 차가운 PBS로 2회 세척한 뒤, RNeasy Mini Kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 QIAGEN의 메뉴얼에 따라 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 2 µg은 High Capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems; Foster City, CA, USA)를 사용하여 single stranded cDNA로 합성하였다. 상대적인 mRNA 발현 수준은 TaqMan analysis를 이용하

여 CFX96™ RT-PCR system(BIO-RAD)을 통해 측정하였다. 프라이머는 모두 Applied Biosystems에서 제조한 HO-1(Assay ID Hs01110250_m1), GPx2(Assay ID Hs01591589_m1), β-actin(Assay ID Hs99999903_m1)을 사용하였으며, 95°C에서 10분간 denaturing 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분의 간격으로 40회 반복하여 증폭하였다.

7. 통계처리

모든 분석은 3회 이상 반복하여 평균±표준오차로 표시하였으며, 실험 결과의 통계적 분석은 SAS 9.2 프로그램(SAS Institute; Cary, NY, USA)을 사용하여 실시하였다. One-way ANOVA(one-way analysis of variance; 일원배치 분산분석)를 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 수행하여 그룹간의 유의한 차이를 확인하였다.

결 과

1. 참죽나무 잎의 플라보노이드 조성 및 함량

참죽나무에서 분리된 플라보노이드 8종은 ESI source를 장착한 quadrupole ToF-MS에서 positive ionization mode 분석 시, 모분자량의 H⁺(m/z 1), Na⁺(m/z 23) 양이온이 확인되었다(Table 1). 이들 중 633[M+Na]⁺, 611[M+H]⁺, 465[M+H-rhamnose]⁺, 449[M+H-glucose]⁺, 303[M+H-rhamnose-glucose]⁺의 패턴을 나타내는 quercetin 3-O-rhamnoside-7-O-glucoside는 본 연구를 통해 참죽나무 잎에서 처음으로 확인되었으며, 고추 및 뽕나무 잎에서는 이미 보고된 바가 있다(Materska 등 2003; Thabti 등 2012; Ju WT 등 2017). 특히 quercetin 3-O-rhamnoside(quercitrin)는 건조중량 100 g당 1,456.0±12.5 mg으로 총 플라보놀 함량(1,874.5±15.5 mg)의 77.7%를 차지하여 참죽나무 잎의 주요 플라보놀 성분으로 확인되었다.

2. 참죽나무 잎 추출물의 에탄올에 따른 HepG2 세포 독성 보호 효과

에탄올 처리 농도에 따른 HepG2 세포의 세포 생존율은 100, 500, 1,000 mM 농도에서 각각 무처리군 대비 98.0±8.5, 64.5±3.6, 56.2±2.9%를 나타내었다(Fig. 1). 에탄올 100 mM은 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. 에탄올 500, 1,000 mM에 노출된 HepG2 세포는 무처리군 대비 세포 생존율이 농도 의존적으로 감소되어 에탄올이 간세포를 손상시킴을 확인할 수 있었으며, 모두 통계적으로 유의했다. 따라서 참죽나무 잎 추출물의 간 세포 독성 보호 효과를 확인하기 위하여 에탄올 500 mM을 처리하였고, 항산화 활성은 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 100 mM 농도의 에탄올을 처리하여 측정하였다. 에탄올 500 mM을 처리해 세포독성을 유도한 HepG2 세

Table 1. Mass spectrometric data and contents of 8 flavonols in *Cedrela sinensis* A. Juss. leaves

| Individual flavonols | MW | Fragment ions (m/z) | Contents (mg/100 g DW) |
|--|-----|--------------------------------|------------------------|
| Kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnoside (afzelin) | 432 | 455, 433, 287 | 129.4±1.4 |
| Quercetin 3- <i>O</i> -arabinoside (gvajaverin) | 434 | 457, 435, 303 | 15.2±0.4 |
| Quercetin 3- <i>O</i> -galactoside (hyperoside) | 464 | 487, 465, 303 | 27.9±0.5 |
| Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside (isoquercitrin) | 464 | 487, 465, 303 | 152.8±0.7 |
| Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnoside (quercitrin) | 448 | 471, 449, 303 | 1,456.0±12.5 |
| Quercetin 3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -galloyl)glucoside | 616 | 639, 617, 303 | 9.1±0.1 |
| Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnoside-7- <i>O</i> -glucoside ¹⁾ | 610 | 633, 611, 465, 449, 303 | 25.0±0.4 |
| Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside (rutin) | 610 | 633, 611, 465, 449, 303 | 59.1±1.0 |
| Total flavonoids | | | 1,874.5±15.5 |

All sample analyzed in positive ESI-ionization mode (m/z, [M+H]⁺) using UPLC-DAD-QToF/MS; [M+Na]⁺ adduct presented. Each value calculated as means±S.D.(n=3) using internal standard (galangin).

¹⁾ New compound tentatively identified.

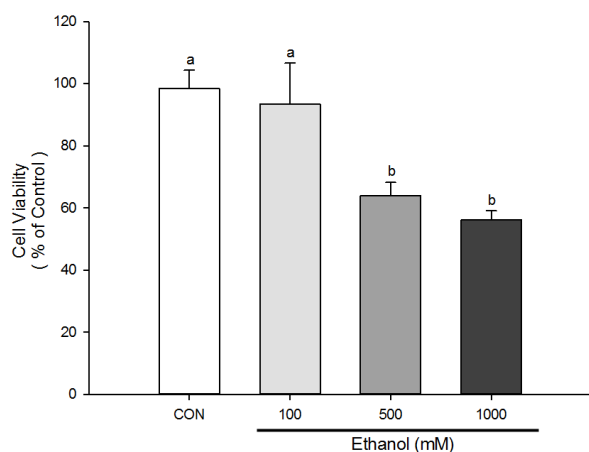


Fig. 1. Effect of ethanol on human hepatoma HepG2 cells. Results are expressed as percent control and represent means±standard deviations (SD) of three independent experiments. Percentage of viable cells was calculated with control cells. Means with different letters (a, b) on the bar are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

포에 참죽나무 잎 추출물을 처리한 HepG2 세포의 세포 생존율은 10, 50, 100 µg/mL 농도에서 각각 101.9±5.7, 106.2±6.3, 116.5±14.8%를 나타내었으며, 참죽나무 잎 추출물의 비교군으로 사용한 퀘르세틴 50 µM에서는 108.7±4.4%를 나타내었다(Fig. 2). 에탄올 처리군과 비교하여 참죽나무 추출물 100 µg/mL 처리군에서 유의적으로 세포보호 효과를 보였다.

3. 참죽나무 잎 추출물의 활성산소종(ROS) 생성 억제 효과

에탄올에 의해 산화스트레스를 받은 HepG2 세포의 ROS 생성능은 DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescin diacetate) 형광 염

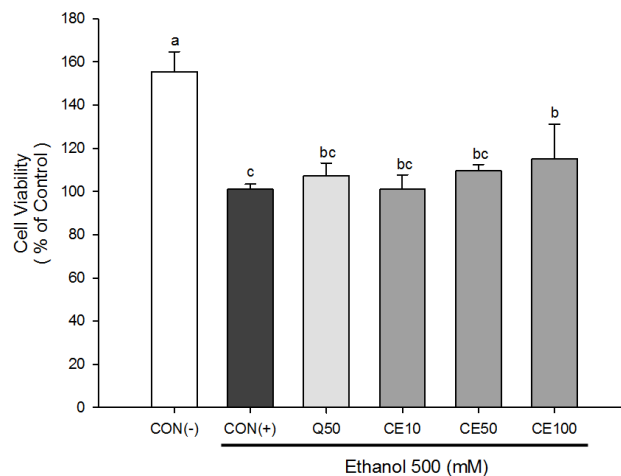


Fig. 2. Effects of *C. sinensis* extract on ethanol-stimulated HepG2 cells. Results are expressed as percent control (+) and represent means±standard deviations (SD) of three independent experiments. Percentage of viable cells was calculated with control (+) cells. Means with different letters (a, b, bc, c) on the bar are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Q50, Quercetin 50 µM; CE10, *C. sinensis* leaves extract 10 µg/mL; CE50, *C. sinensis* leaves extract 50 µg/mL; CE100, *C. sinensis* leaves extract 100 µg/mL; CE500, *C. sinensis* leaves extract 500 µg/mL.

색법을 통해 확인하였다. DCFH-DA가 세포막을 통과하면 세포 내 esterase에 의해 효소적으로 가수분해되어 비형광 DCFH(2',7'-dichlorofluorescin)가 되고, ROS가 존재할 때 DCFH는 빠르게 산화되어 형광이 강한 DCF(2',7'-dichlorofluorescin)가 된다(Bass 등 1983; LeBel 등 1992). DCFH(2',7'-dichlorofluorescin)의 산화 생성물인 DCF(2',7'-dichlorofluorescin)는 녹

색 형광을 띤다. HepG2 세포에 에탄올 100 mM을 처리하여 에탄올에 의한 ROS 생성을 확인하고, 농도별 참죽나무 잎 추출물(10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) 및 퀘르세틴(50 μM)을 처리한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. HepG2 세포에 에탄올 100 mM을 처리한 결과, ROS는 $72.1 \pm 4.7\%$ 에서 $100.0 \pm 2.9\%$ 로 증가하였고,

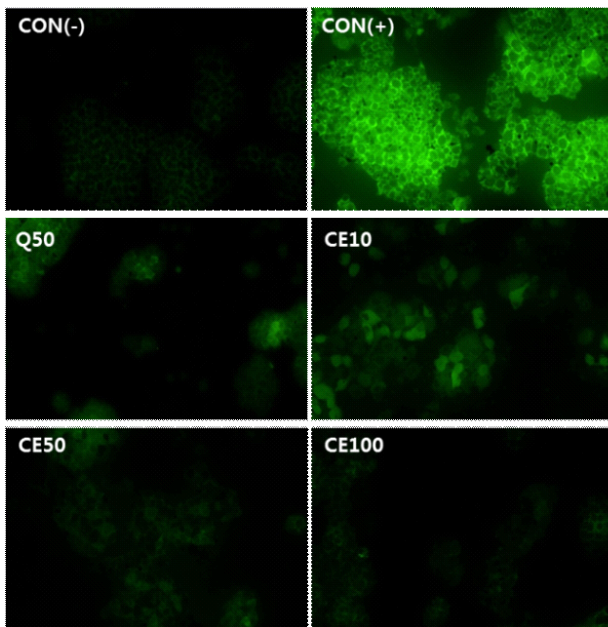
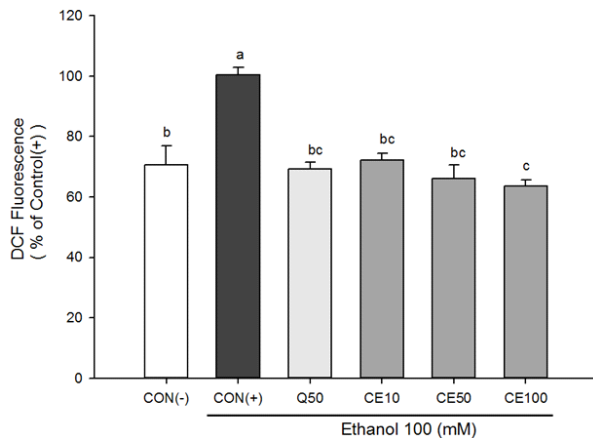


Fig. 3. Effect of *C. sinensis* leaves extract on ROS generation. Results are expressed as percent control (+) and represent means \pm standard deviations (SD) of three independent experiments. Percentage of viable cells was calculated with control (+) cells. Means with different letters (a, b, bc, c) on the bar are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Q50, Quercetin 50 μM ; CE10, *C. sinensis* leaves extract 10 $\mu\text{g/mL}$; CE50, *C. sinensis* leaves extract 50 $\mu\text{g/mL}$; CE100, *C. sinensis* leaves extract 100 $\mu\text{g/mL}$.

형광이미지에서도 뚜렷한 차이를 보였다. 퀘르세틴(50 μM) 및 참죽나무 잎 추출물 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 생성된 ROS는 에탄올 처리군 대비 각각 66.7 ± 4.6 , 70.0 ± 4.5 , 66.0 ± 4.6 , $63.2 \pm 2.5\%$ 로 에탄올 무처리군 수준으로 감소하였다.

4. 참죽나무 잎 추출물의 항산화 효소 mRNA 발현 증가 효과

에탄올(100 mM) 처리에 의해 세포 내 항산화 효소 (Anti-oxidative enzyme)인 Heme oxygenase-1(HO-1), Glutathion peroxidase(GPx)의 mRNA 발현이 무처리군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 퀘르세틴(50 μM)과 참죽나무 잎 추출물에서 유의적으로 증가하였다(Fig. 4). GPx mRNA의 발현은 참죽나무 잎 추출물의 농도 의존적으로 증가하였다.

고찰

활성산소종(Reactive Oxygen Species: ROS)은 미토콘드리아 대사활동을 통해 생성되는 반응성이 강한 산소 함유 분자로서 특히 간에서 복잡한 세포 분자와 반응하여 산화적 스트레스를 유발하는 물질이다(Choi 등 2012). 에탄올 대사 과정에서는 ROS가 생성되어 산화스트레스를 유발하며, 과도한 에탄올은 ROS를 제거하는 항산화 시스템을 억제함으로써 지방, 단백질 또는 DNA와 같은 생체 분자에 산화 손상을 유발하여 세포를 손상시킨다(Koch 등 2004; Albano E 2006). 참죽나무 잎의 주요 성분인 퀘르세틴은 식물에서 주로 글리코사이드(glycoside) 형태로 존재한다. 글리코사이드는 아글리콘(aglycone) 형태보다 잘 흡수되며, 지질의 과산화를 막는 등 항산화 특성을 갖는 것으로 알려져 있다(Wagner 등 2006). 따라서 본 연구에서는 항산화 활성을 갖는 퀘르세틴을 다량 함유한 참죽나무 잎이 알코올로 인해 손상된 간을 개선시킬 것이라는 가설을 검토하고자 하였다.

알코올의 과량 섭취는 간의 SOD, catalase, HO-1, GPx 등 항산화 효소의 활성을 감소시키고, 글루타치온, 비타민 C, 비타민 E 등의 항산화 물질을 감소시킨다(Jin 등 2010). 알코올에 의한 간 세포의 항산화능 감소는 다양한 알코올성 간질환 유발의 원인이 된다. 또한, 유리 heme은 활성산소종을 생성함으로써 산화스트레스를 유도하고 세포 손상을 유발한다. 이 때, HO-1은 유리 heme을 제거하여 산화스트레스에 의한 세포 및 조직의 손상을 보호하는 역할을 한다(Tang 등 2012). 본 연구에서 에탄올 100 mM 처리군은 무처리군과 비교하여 HO-1 mRNA 발현을 감소시켰다. 이를 통해, 에탄올이 HO-1을 억제하여 간세포에 산화스트레스를 유발함을 확인할 수 있었다. 참죽나무 잎 추출물 및 퀘르세틴의 처리는 에탄올에 의해 감소된 HO-1 mRNA의 발현을 에탄올 무처리군 수준으로 회복

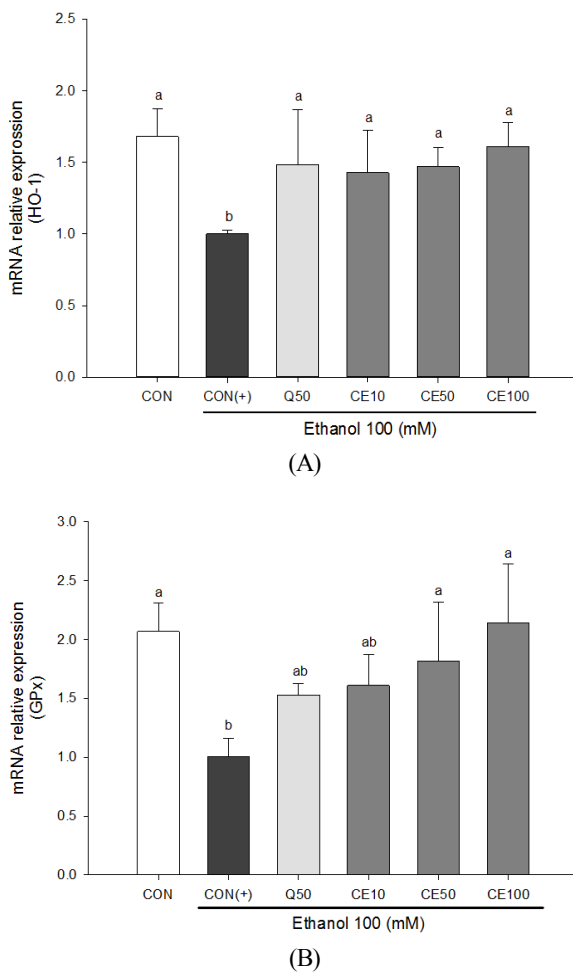


Fig. 4. Effect of *C. sinensis* leaves extract on heme oxygenase-1 (HO-1) and glutathione peroxidase (GPx) mRNA.

Results are expressed as percent control (+) and represent means \pm standard deviations (SD) of three independent experiments. Percentage of viable cells was calculated with control (+) cells. Means with different letters (a, b, ab) on the bar are significantly different from each other at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Q50, Quercetin 50 μ M; CE10, *C. sinensis* leaves extract 10 μ g/mL; CE50, *C. sinensis* leaves extract 50 μ g/mL; CE100, *C. sinensis* leaves extract 100 μ g/mL.

시켰다. 대식세포(RAW264.7 cells)에서 퀘르세틴이 산화스트레스(H_2O_2)로 유도된 세포사멸과 ROS 생성을 억제하며, 이는 HO-1 단백질에 의한 것으로 보고되어 있다(Chow 등 2005). 이는 퀘르세틴 계열 화합물(quercetin 3-O-rhamnoside, 1,456.0 mg/DW 등)을 다량 함유한 참죽나무 잎의 항산화 효과를 뒷받침해주는 것으로 판단되었다. 항산화 효소인 GPx는 체내에 생성된 산소유리기를 제거함으로써 산화적 자극으로 인한 세포 손상을 방지한다(Nordmann R 1994). 참죽나무 잎 추출물은

에탄올 처리에 의해 감소된 HO-1, Gpx 등의 항산화 효소의 발현을 증가시켜 에탄올에 의한 산화적 스트레스를 억제하고, 세포사멸을 보호하는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 참죽나무 잎 추출물이 에탄올로 유도된 산화스트레스로부터 간세포를 보호하며, 항산화 효소 유전자 발현을 증가시킴으로써 항산화 활성을 보이는 것으로 사료된다. 또한, 참죽나무 잎에는 플라보노이드가 다량 함유되어 있으며, 특히 퀘르세틴 배당체인 quercetin 3-O-rhamnoside (quercitrin)는 건조중량 100 g당 $1,456.0 \pm 12.5$ mg으로 총 플라보놀 함량($1,874.5 \pm 15.5$ mg)의 77.7%를 차지하여 참죽나무 잎의 주요 플라보놀 성분으로 확인되었다. 결론적으로 참죽나무 잎 추출물은 알코올에 의한 간 세포의 손상을 보호하고, 산화스트레스를 감소시켰으며, 이는 참죽나무 잎의 주요 플라보노이드인 퀘르세틴과 비교했을 때도 그 효과가 우수함을 확인하였다. 따라서 참죽나무 잎은 알코올에 의해 손상된 간을 보호하는 식품으로서 이용가치가 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술연구개발사업(과제번호 PJ01265802)의 연구비 지원으로 이루어진 것이며, 그 지원에 감사드립니다.

References

- Albano E. 2006. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 65:278-290
- Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds M, Thomas M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130:1910-1917
- Cederbaum AI. 1990. Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement* 1:291-296
- Choi CH, Won DH, Hwang JP, Park SN. 2012. Antioxidative effect of extracts from different parts of *Juncus effusus* L. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 38:275-282
- Chow JM, Shen SC, Huan SK, Lin HY, Chen YC. 2005. Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H_2O_2 -

- induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol* 69: 1839-1851
- Das SK, Nayak P, Vasudevan DM. 2005. Consequences of ethanol consumption. *J Indian Soc Toxicol* 1:1-10
- Jin DC, Jeong SW, Park PS. 2010. Effects of green tea extract on acute ethanol-induced hepatotoxicity in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:343-349
- Ju WT, Kwon OC, Lee MK, Kim HB, Sung GB, Kim YS. 2017. Quali-quantitative analysis of flavonoids for mulberry leaf and fruit of 'Suhyang'. *Korean J Environ Agric* 36:249-255
- Jung BS. 1991. Metabolic effects of alcohol. *Korean J Food Nutr* 4:207-211
- Kim HJ, Yong HI, Park S, Park J, Jung S, Choe W, Jo C. 2017. Effect of surface dielectric barrier discharge on the physiological activities of quercetin. *Korean J Food Nutr* 30:290-296
- Kim SY, Lee MH, Jo NR, Park SN. 2010. Antibacterial activity and skin moisturizing effect of *Cedrela sinensis* A. Juss shoots extracts. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 36:315-321
- Kim YJ, Kim HW, Lee MK, Lee SH, Jang HH, Hwang YJ, Choe JS, Lee SH, Cha YS, Kim JB. 2017. Comparison of flavonoid characteristics between blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and black raspberry (*Rubus coreanus*) cultivated in Korea using UPLC-DAD-QTOF/MS. *Korean J Environ Agric* 36:87-96
- Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Cravero A, Farrè S, Galeotti T. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med* 25:191-198
- Kukielka E, Dicker E, Cederbaum AI. 1994. Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Arch Biochem Biophys* 309:377-386
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231
- Mantle D, Preedy V. 1999. Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 18:235-252
- Materska M, Piacente S, Stochmal A, Pizza C, Oleszek W, Perucka I. 2003. Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry* 63:893-898
- Nordmann R. 1994. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* 29:513-522
- Park JC, Chon SS, Yang HS, Kim SH. 1993. Studies on the chemical components and biological activities of edible plants in Korea-(2)-Isolation and quantitative analysis of flavonoids from the leaves of *Cedrela sinensis* A. Juss. by HPLC. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 22:581-585
- Park JC, Yu YB, Lee JH, Kim NJ. 1994. Studies on the chemical components and biological activities of edible plants in Korea-(6)-Anti-inflammatory and analgesic effects of *Cedrela sinensis*, *Oenanthe javanica* and *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 23:116-119
- Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. 2012. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochem Pharmacol* 83:6-15
- Sergent O, Griffon B, Cillard P, Cillard J. 2001. Alcohol et stress oxydatif. *Pathologie Biologie* 49:689-695
- Shin HJ, Jeon YJ, Shin HJ. 2008. Physiological activities of extracts of *Cedrela sinensis* leaves. *KSBB Journal* 23:164-168
- Tang Y, Gao C, Shi Y, Zhu L, Hu X, Wang D, Lv Y, Yang X, Liu L, Yao P. 2012. Quercetin attenuates ethanol-derived microsomal oxidative stress: Implication of haem oxygenase-1 induction. *Food Chem* 132:1769-1774
- Thabti I, Elfalleh W, Hannachi H, Ferchichi A, Campos MDG. 2012. Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J Funct Foods* 4:367-374
- Wagner C, Fachineto R, Dalla Corte CL, Brito VB, Severo D, Dias GOC, Morel AF, Nogueira CW, Rocha JBT. 2006. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. *Brain Res* 1107:192-198
- Wu D, Cederbaum AI. 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 27:277-284

Received 23 March, 2018
 Revised 12 June, 2018
 Accepted 02 July, 2018