

Anti-oxidative Activity of Five Plant Extracts including *Apios fortune*, *Colubrina arborescens*, *Croton caudatus*, *Osmanthus matsumuranus* and *Schima noronhae*

Su Hyeon Lee¹, Kyong-Suk Jin¹, Hyun Ju Kwon^{1,2} and Byung Woo Kim^{1,2*}

¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

²Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received May 29, 2018 / Revised July 4, 2018 / Accepted July 17, 2018

This study was orchestrated with the purpose of uncovering new nutraceutical resources possessing biological activities in the plant kingdom. To fulfill our objective, we analyzed several plant extracts and selected five species possessing powerful anti-oxidative activity. The anti-oxidative effect of these five plants, *Apios fortunei* Maxim., *Colubrina arborescens* Sarg., *Croton caudatus* Geiseler, *Osmanthus matsumuranus* Hayata and *Schima noronhae* Reinw. ethanol extracts were then evaluated by using *in vitro* assay, cell model system, and Western blot analysis of target proteins. As the results, all of them possessed the potent scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), similar with that of ascorbic acid, used as a common positive control. Moreover, they strongly inhibited hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced reactive oxygen species (ROS), in a dose-dependent manner, in RAW 264.7 murine macrophage cells. Furthermore, they induced the protein expression of an anti-oxidative enzyme, heme oxygenase 1 (HO-1), and its upstream transcription factor, nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2). Taken together, these results indicate that these five plants possess potent anti-oxidative activity and thus appear to be useful sources as potential anti-oxidant agents. Therefore, they might be utilized as promising materials in the field of nutraceuticals.

Key words : Anti-oxidative activity, five plants extracts, heme oxygenase 1, nuclear factor-E2-related factor 2

서 론

생명체의 호흡과 대사과정에서 끊임없이 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산화적 스트레스를 유발하여 세포 손상을 일으킬 뿐 아니라, 세포 내 주요 염증 유발 인자를 활성화시킴으로써 염증을 초래한다[8, 33]. 이러한 산화적 스트레스는 암, 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 당뇨병 등 생체 내에서 발생하는 수많은 질환의 원인이 될 뿐 아니라, 노화를 일으키는 직·간접적인 원인으로 작용한다[2, 7, 14, 32, 33]. 그러므로 세포는 항상 적정 수준의 항산화 물질의 보루를 필요로 하며, 인체에 발생하는 수많은 질병에 대응하기 위해서는 강한 항산화능을 보유한 생리활성 소재의 개발이 매우 중요하다[22, 34].

세포의 항산화 시스템에서 중요한 구성요소인 heme oxygenase (HO)의 유도제 중 하나인 HO-1은 일반적으로 heme을 대사시키는 효소로 잘 알려져 있으며, 대사산물로 담록소,

일산화탄소 및 2가 철 이온을 방출한다. 담록소는 담록소 환원 효소에 의해 강력한 항산화 인자인 빌리루빈으로 전환된다[40]. HO-1은 저산소증, 금속이온 및 염증성 사이토카인 등과 같은 산화적 스트레스 환경을 유도하는 자극에 의해 합성이 유도되며, 산화적 스트레스에 대항하여 세포 내 산화-환원(reduction-oxidation, redox) 균형을 유지하는데 기여한다[6, 13, 20, 39]. HO-1의 발현은 일차적으로 전사단계에서 조절되며 상위전사인자인 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다[35]. 상위전사인자로서의 Nrf2는 HO-1과 같은 항산화 효소 유전자의 프로모터에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 항진시킴으로써 산화적 스트레스에 대한 생체방어기전의 핵심적 역할을 담당한다[1, 11]. 이러한 생체방어기전은 항산화 활성을 기초로 하여 암, 염증, 뇌 및 심혈관계 질환, 노화 등의 예방 및 치료 기전과도 상호작용하는 것으로 밝혀지고 있어 그 중요성이 매우 크다[3, 18, 37, 41].

천연물에 존재하는 화합물들은 생체에 유용한 다양한 생리활성을 보유하고 있어 기능성 소재의 새로운 자원으로 각광받고 있으며, 이에 따라 천연 소재로부터 유용성분을 추출하여 소재가 보유한 활성을 밝혀내고 기능성 소재로서의 활용성을 타진하는데 많은 연구와 관심이 집중되고 있다[16, 19, 29]. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 항산화 생리활성 보유 신

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2900, Fax : +82-505-182-6951

E-mail : bwkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

소재 개발의 일환으로 식물추출물 백 종의 생리활성을 분석하여 그 중 잘 알려진 대표적인 항산화제로서 많은 연구에서 양성대조군으로 사용되는 비타민 C, 즉 아스코르빈산과 유사한 정도의 높은 항산화능을 보이는 다음의 5종 식물, 즉 *Apios fortunei* Maxim., *Colubrina arborescens* Sarg., *Croton caudatus* Geiseler, *Osmanthus matsumuranus* Hayata 그리고 *Schima noronhae* Reinw.를 선별하였다. *A. fortunei* Maxim.은 콩과(Fabaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 초본식물로 토란이라고도 불린다. 중국의 하남, 대만, 광둥, 사천, 귀주 등지에 분포하며 비교적 습한 산비탈, 관림목 속이나 밭두렁에서 자란다. 꽃은 6-8월에 피고 열매는 9-10월에 맺히며, 덩이 뿌리는 약용 혹은 식용으로 이용된다. 현재까지 *A. fortunei*의 초과산화물 소거 활성[23]에 대해 보고된 바는 있지만 에탄올 추출물의 항산화 활성과 그 작용 기작에 대해서는 보고된 바 없다. *C. arborescens* Sarg.는 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속하는 상록수로 푸에르토리코, 멕시코, 코스타리카 등 북아메리카 등지에 분포한다. 약 25 m까지 자라며, 잎은 타원형으로 가지 끝에 두 줄로 번갈아 나있고, 거의 일 년 내내 꽃을 피우며 5-7월에 열매를 맺는다. *C. arborescens*와 동일한 갈매나무과에 속한 *C. asiatica*의 항산화 활성[26]에 대해서는 보고된 바 있지만 현재까지 *C. arborescens*의 항산화 활성에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다. *C. caudatus* Geiseler는 대극과(Euphorbiaceae)에 속하는 관목의 일종으로 중국 남부지방, 네팔, 방글라데시, 말레이시아, 필리핀 등지에 분포하며 주로 산비탈에서 자란다. *C. caudatus*의 보고된 생리활성으로는 항암, 항산화, 항균, 항염 활성과 통증완화, 해열효과가 있다[4, 5, 24, 27, 28, 31]. 한편 Deore 등[4]이 수행한 선행연구에서 *C. caudatum* 에탄올 추출물의 항산화 활성에 대해 기술하고 있지만, 본 연구에서 수행한 실험 중 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능을 제외하고는 다른 실험계를 사용하였으므로 직접적인 비교 분석은 어려운 것으로 판단된다. *O. matsumuranus* Hayata는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 키가 작은 상록수의 일종으로 중국, 일본, 베트남, 타이완, 캄보디아 등 동아시아 지역에 주로 서식한다. *O. matsumuranus*의 보고된 생리활성으로는 에탄올 추출물의 항암 활성[12]이 있으며, 동일한 물푸레나무과인 물푸레나무(*F. rhynchophylla*)의 항산화, 항균, 미백 효과[15, 9]에 대해서는 보고되어 있지만 *O. matsumuranus*의 항산화 효과에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다. 마지막으로 *S. noronhae* Reinw.는 차나무과(Theaceae)에 속하는 상록수로 높이가 약 47 m까지 자라며 중국, 말레이시아, 베트남, 태국 등지에 주로 분포한다. 현재까지 *S. noronhae*와 동일한 차나무과인 *S. wallichi*의 항산화 활성[17]과 *S. noronhae*의 세포성장 저해활성[38]에 대해서는 보고되어 있으나 그 외 생리활성에 대해서는 알려진 바가 없으며, 특히 항산화 효과에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 이상 5종의 식물 추출물이 보유한 항산화 활성을 분석함으로써 각 소재의

기능성 자원으로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

5종 식물 추출물의 준비

본 연구에 사용한 *A. fortunei*, *C. arborescens*, *C. caudatus*, *O. matsumuranus* 그리고 *S. noronhae*의 95% 에탄올 추출물(이하 AFEE, CAEE, CCEE, OMEE, SNEE)은 한국생명공학연구원, 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FBM123-016, 022, 067, 083, 099)하여 사용하였으며 그 추출 과정은 다음과 같다. 건조 및 분쇄한 시료를 95% 에탄올을 이용하여 45°C에서 15분간 초음파 추출(sonication) 후 2시간 정지시키는 과정을 하루 10회씩 반복하여 총 3일간 추출을 수행하였다. 추출이 끝난 시료를 여과지에 걸러 고형물을 없애고 45°C에서 감압농축(N-1000SW, EYELA, Tokyo, Japan)한 후 동결 건조(FDU 2100, EYELA, Tokyo, Japan)하여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

DPPH 라디칼 소거능 분석

전자공여능은 항산화 작용의 주요 지표로서 활용되고 있으며 DPPH 자유 라디칼 소거능의 측정을 통해 분석할 수 있다. DPPH는 비교적 안정한 자유 라디칼로 520 nm 부근에서 특징적인 광흡수를 나타내는 짙은 보라색의 화합물이며, 자유 라디칼 소거활성이 있는 물질에 의해 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변하게 된다. DPPH에 의한 자유 라디칼 소거활성은 지질과산화 억제활성 등 항산화 활성과 깊은 상관관계를 보이므로 천연물의 항산화 활성 분석에 주로 이용되고 있다[7, 36]. 이러한 DPPH 라디칼 소거 활성 측정을 위해 각 시료를 농도별(0.1024-12.8 µg/ml)로 메탄올에 녹여 준비하고, 96 well plate에서 메탄올에 용해된 1.5×10⁻⁴ M DPPH 40 µl와 각 시료 160 µl를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, multi-plate reader (Paradigm, Beckman, Brea, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군에 대비하여 자유라디칼 소거 정도를 백분율로 나타내고, 활성산소를 50% 소거하는 농도(Radical scavenging Concentration, RC₅₀)를 계산하였다. 대표적인 항산화제로 DPPH 라디칼 소거능 측정 시 양성 대조군으로 주로 사용되는 아스코르빈산을 함께 비교 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

RAW 264.7 세포주의 배양 및 5종 추출물의 세포독성 분석

항산화 활성의 분석은 쥐 대식세포주인 RAW 264.7을 American Type Tissue Collection (ATCC®, TIB-71™, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하여 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 및 항생제penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배

지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 먼저 추출물이 지닌 세포독성 유무 확인과 함께 이후 실험 농도의 결정을 위해 RAW 264.7 세포주를 24-well tissue culture plate에 well 당 3.0×10⁵ 개씩 분주하여 부착시킨 후, 각 추출물에 의한 세포 독성 유발 유무를 WST assay를 통해 분석하였다. 시료 처리 24 시간 후 WST 시약(Daeil Lab Service, Daejeon, South Korea)이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 반응시키고, multiplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었으며 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 이후 실험을 수행하였다.

5종 추출물의 ROS 소거능 분석

ROS는 세포막 분해, 단백질 분해, 지방 산화, DNA 손상 및 합성 억제 등을 일으켜 세포손상의 주요 원인이 되므로, 이러한 ROS를 소거하는 활성은 항산화능의 중요한 지표로 활용된다[21, 25]. H₂O₂는 대표적인 ROS 중 하나로 소제의 항산화능을 규명하기 위한 많은 연구에서 ROS 유도제로 사용되고 있다[30, 32, 34]. 본 연구에서는 DPPH 라디칼 소거능이 확인된 각 추출물의 항산화능을 세포 수준에서 좀 더 자세히 알아보기 위해 H₂O₂로 유도한 ROS 생성에 시료가 미치는 영향을 분석하였다. 이를 위해 RAW 264.7 세포주에 세포 침투성 형광 염료인 50 µM의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 2시간 동안 전 처리한 후 세포내로 유입되지 않은 여분의 DCFH-DA를 제거하고, 0.5 mM의 H₂O₂와 농도 별 시료를 함께 처리한 후 시료의 ROS 생성 억제능의 정도를 multiplate reader를 이용한 형광 측정을 통해 분석하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

항산화 효소 HO-1 및 상위전사인자 Nrf2의 단백질 발현 분석

각 추출물이 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보기 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1과 그 상위전사인자인 Nrf2의 단백질 발현에 미치는 영향을 Western blot hybridization으로 분석하였다. HO-1의 일차항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였고, Nrf2와 actin의 일차항체와 anti-goat, anti-rabbit 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Paso Robles, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 계산한 후, 50 µg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전사한 후 1:1,000-5,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 혼성화하였다. Membrane 수세 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시키고 화학발광검출법(chemiluminescence detection

system, FluoChem® FC2, AlphaInnotech, San Jose, CA, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 데이터를 제시하였다.

통계 분석

모든 실험의 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 각 데이터의 통계 분석은 SPSS 20.0 software를 이용한 unpaired Student's *t*-test를 통해 *p* 값이 0.05 미만(*p*<0.05)인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 소거 활성을 통한 항산화능 분석

이상의 실험을 통한 5종 식물 추출물의 항산화능 활성의 분석 결과는 다음과 같다. 먼저 5종 추출물의 항산화능 보유 유무 및 그 정도를 알아보기 위해 항산화능의 주요 지표 중 하나인 DPPH 라디칼 소거활성을 분석한 결과 Table 1에 제시된 바와 같이 AFEE, CAEE, CCEE, OMEE 그리고 SNEE 모두 농도 증가에 따른 강한 라디칼 소거능을 보여 12.8 µg/ml의 시료 처리에 의해 DPPH 라디칼 소거능이 각각 96.2, 95.5, 96.7, 96.4, 97.6%로 나타났다. 이는 양성 대조군으로 사용한

Table 1. DPPH radical scavenging activity of five plant extracts

Reagent	Concentration (µg/ml)	Scavenging activity (%)	RC ₅₀ (µg/ml)
AFEE	0.1024	24.00±0.28	1.09
	0.512	36.79±0.50	
	2.56	83.32±0.23	
	12.8	96.20±0.03	
CAEE	0.1024	15.44±0.54	1.32
	0.512	21.78±0.46	
	2.56	94.21±0.25	
	12.8	95.53±0.16	
CCEE	0.1024	28.98±0.99	1.03
	0.512	37.39±0.31	
	2.56	87.35±0.91	
	12.8	96.73±0.10	
OMEE	0.1024	23.25±0.61	1.87
	0.512	28.19±0.36	
	2.56	61.09±0.42	
	12.8	96.35±0.10	
SNEE	0.1024	24.00±0.33	1.20
	0.512	35.03±0.62	
	2.56	79.74±0.51	
	12.8	97.55±0.48	
Ascorbic acid (Positive control)	0.512	28.63±0.63	1.15
	2.56	96.73±0.04	
	12.8	97.79±0.17	

아스코르빈산의 97.8%와 유사한 정도의 활성으로, 이를 통해 5종 식물 추출물이 매우 강한 DPPH 라디칼 소거능을 보유함을 의미한다. 각 소재의 DPPH 라디칼에 대한 50% 소거 농도를 나타내는 RC₅₀ 값은 AFEE, CAEE, CCEE, OMEE, SNEE가 각각 1.09, 1.32, 1.03, 1.87, 1.20 µg/ml로 나타났으며, 양성대조군 아스코르빈산의 RC₅₀ 값은 1.15 µg/ml로 산출되었다. 한편 Deore 등[4]이 수행한 선행연구에서 *C. caudatum* 에탄올 추출물 60 mg/ml 처리에 의한 DPPH 라디칼 소거능이 94.6%로 나타나 본 연구에서 분석한 결과에 비해 낮은 활성을 보였다. 해당 연구의 세부 추출조건이 제시되어있지 않아 직접적인 비교는 힘들다, 일부 실험 조건이나 시료 상태 등 세부 실험 조건상의 차이에서 기인할 수 있을 것으로 판단된다.

세포 생존율에 미치는 영향 분석

5종 식물 추출물이 강한 DPPH 라디칼 소거능을 보유함이 확인됨에 따라, 각 소재가 보유한 항산화능의 정도 및 기전을 세포 수준에서 확인하고자 하였다. 세포 수준에서의 생리활성을 분석하기에 앞서 각 시료가 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 Fig. 1에 제시한 바와 같이 각 추출

물을 농도별(0-200 µg/ml)로 24시간 동안 처리하였을 때, AFEE의 경우 세포 독성의 유발 없이 시료 농도 증가에 따라 세포생존율이 증가되는 양상을 보였다. CAEE는 분석한 모든 농도에서 세포독성을 유발하지 않았고, CCEE의 경우 시료의 농도 증가에 따라 세포 생존율이 다소 감소되었으나 강한 독성은 보이지 않았다. OMEE의 경우 150 µg/ml까지는 세포독성을 유발하지 않았으나 200 µg/ml에서는 세포생존율이 88.68%로 약한 감소를 보였으며, SNEE는 일부 농도에서 세포 생존율의 약한 감소를 보였으나 농도 증가에 따른 세포 독성은 보이지 않았다.

ROS 소거능 분석

상기와 같이 5종의 식물 추출물이 세포 독성을 보이지 않음을 확인한 후, RAW 264.7 세포주에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H₂O₂를 처리하여 추출물이 보유한 ROS 소거능을 분석하였다. 그 결과 Fig. 2에 제시한 바와 같이 H₂O₂에 의해 유도되는 과량의 ROS 생성이 각 추출물에 의해 농도의존적으로 효과적인 저해 활성을 보여, 5종의 소재가 DPPH 라디칼 뿐만 아니라 세포 수준에서 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트

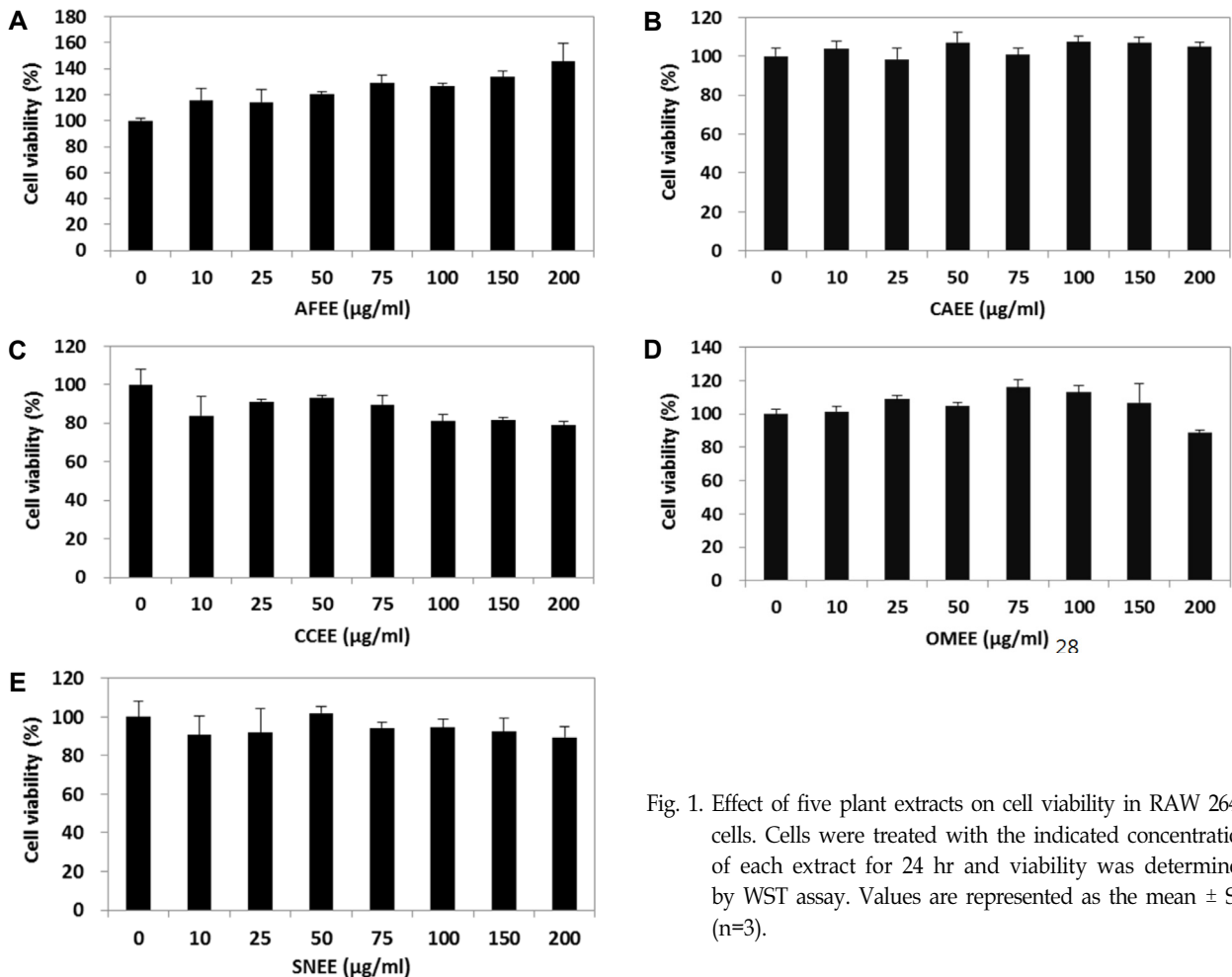


Fig. 1. Effect of five plant extracts on cell viability in RAW 264.7 cells. Cells were treated with the indicated concentration of each extract for 24 hr and viability was determined by WST assay. Values are represented as the mean ± SD (n=3).

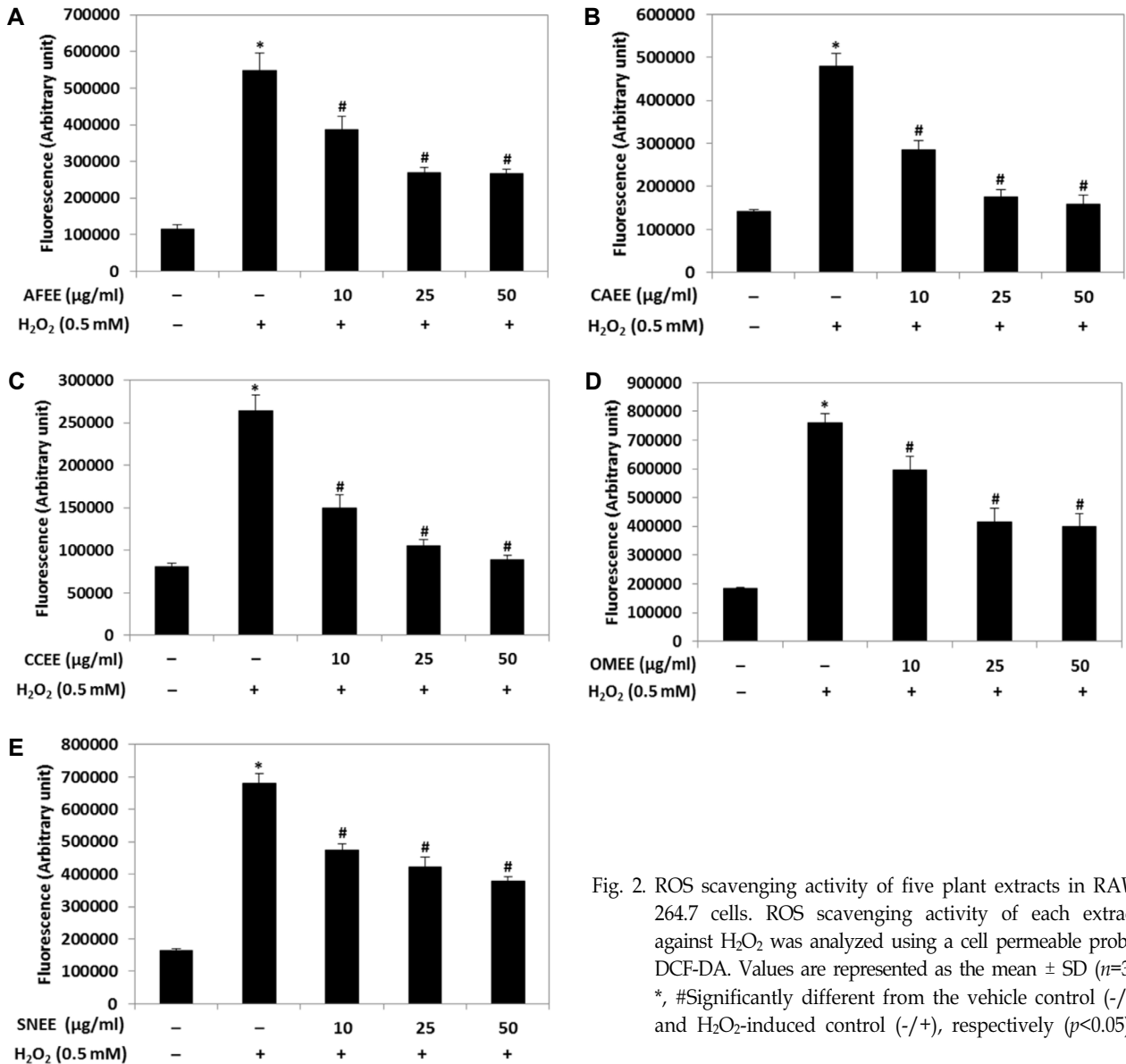


Fig. 2. ROS scavenging activity of five plant extracts in RAW 264.7 cells. ROS scavenging activity of each extract against H₂O₂ was analyzed using a cell permeable probe, DCF-DA. Values are represented as the mean ± SD (n=3). *, #Significantly different from the vehicle control (-/-) and H₂O₂-induced control (-/+), respectively (p<0.05).

레스 또한 효과적으로 감소시킴을 확인하였다.

항산화 효소 HO-1 및 상위 전사인자 Nrf2의 단백질 발현에 미치는 영향

강한 항산화능을 보유한 천연 유래 소재들의 작용 기전이 전사인자 Nrf2에 의한 HO-1 등의 항산화 효소 발현 유도를 통해 조절된다는 것이 여러 연구를 통해 밝혀짐에 따라 각 추출물이 보유한 항산화능의 작용기작을 알아보기 위해 시료 처리에 의한 HO-1 및 Nrf2의 단백질 발현 변화를 분석하였다 [10, 37]. 그 결과 Fig. 3에 제시한 바와 같이 각 추출물을 농도별(0-50 µg/ml)로 6시간 동안 처리하였을 때 CAEE, OMEE 그리고 SNEE의 시료 농도 증가에 따른 HO-1과 Nrf2의 단백질 발현 증가가 관찰되었다. AFEE와 CCEE는 6시간 시료 처리 시 대상 단백질 발현에 큰 영향을 주지 않았으나, 각 소재가

보유한 대상 단백질의 발현 유도 시기 및 정도에 차이가 있을 수 있는 점을 감안하여 AFEE와 CCEE를 농도별(0-50 µg/ml)로 24시간 동안 처리한 결과 처리 농도 증가에 따른 HO-1과 Nrf2의 단백질 발현 증가가 관찰되었다. 이는 각 소재가 항산화 효소 및 그 전사인자의 발현을 유도하는 시간 및 정도의 차이는 있으나, 상위전사인자 Nrf2에 의해 조절되는 항산화 효소 HO-1의 발현 유도를 통해 항산화능을 나타낼 수 있는 가능성을 시사하였다.

이상의 결과를 통해 5종 식물 추출물의 DPPH 라디칼 소거, 세포내 ROS 생성 억제, 항산화 효소계 발현 유도 등을 통한 강한 항산화 활성을 확인하였으며, 이러한 결과는 신규 소재에 대한 새로운 기능성 데이터를 구축함과 동시에 향후 생리 활성 보유 천연물 소재로서의 활용을 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 지속적인 연구를 통해 각 소재가 보유

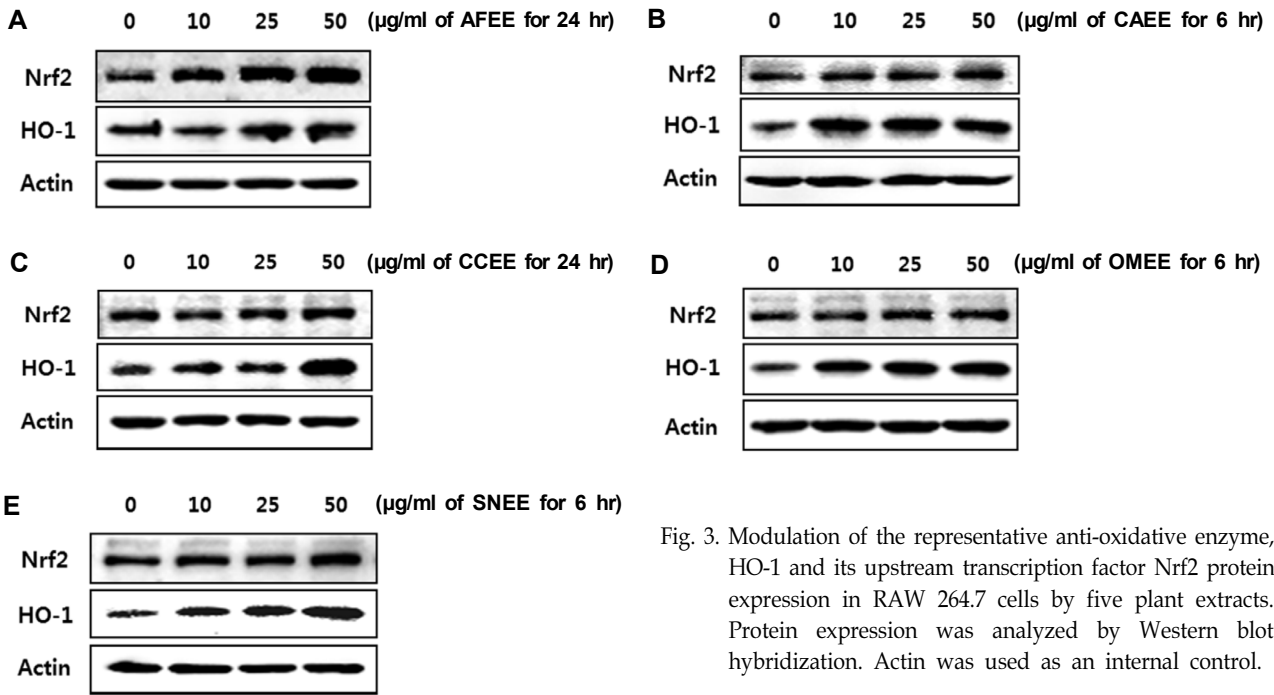


Fig. 3. Modulation of the representative anti-oxidative enzyme, HO-1 and its upstream transcription factor Nrf2 protein expression in RAW 264.7 cells by five plant extracts. Protein expression was analyzed by Western blot hybridization. Actin was used as an internal control.

한 항산화능의 세부 기작을 규명해야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 부산광역시 지원 항노화 바이오산업 육성 사업 (2018-항노화-01)과 중소기업부·부산광역시 지원 지역 혁신센터사업(B0010792) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어졌습니다.

References

- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J. and Motterlini, R. 2003. Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant responsive element. *Biochem. J.* **371**, 887-895.
- Cencioni, C., Spallotta, F., Martelli, F., Valente, S., Mai, A., Zeiher, A. M. and Gaetano, C. 2013. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 17643-17663.
- Chapple, S. J., Siow, R. C. and Mann, G. E. 2012. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1315-1320.
- Deore, S. L., Baviskar, B. A., Khangenbam, R. A., Koli, U. S., Daga, N. P., Gadail, P. A. and Jain, P. A. 2009. *In vitro* antioxidant activity and phenolic content of *Croton caudatus*. *Int. J. ChemTech Res.* **1**, 174-176.
- Dey, S., Mukherjee, D., Chakraborty, S., Mallick, S., Dutta, A., Ghosh, J., Swapana, N., Maiti, S., Ghorai, N., Singh, C. B. and Pal, C. 2015. Protective effect of *Croton caudatus*

- Geisel leaf extract against experimental visceral leishmaniasis induces proinflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Parasitol.* **151/152**, 84-95.
- Durante, W., Kroll, M. H., Christodoulides, N., Peyton, K. J. and Schafer, A. I. 1997. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **80**, 557-564.
- Gonzalez-Burgos, E. and Gomez-Serranillos, M. P. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5319-5341.
- Harman, D. 2009. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology* **10**, 773-781.
- Hong, Y. D., Nam, M. H., Lee, C. S., Shin, S. S. and Park, Y. H. 2014. Depigmenting effects of esculetin and esculin isolated from *Fraxinus rhynchophylla* Hance. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **40**, 89-94.
- Hu, R., Saw, C. L., Yu, R. and Kong, A. N. 2010. Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with antiinflammatory. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1679-1698.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313-322.
- Jin, S., Park, H. J., Oh, Y. N., Kwon, H. J., Kim J. H., Choi, Y. H. and Kim, B. W. 2015. Anti-cancer activity of *Osmanthus matsumuranus* extract by inducing G2/M arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J. Cancer Prev.* **20**, 241-249.

13. Keyse, S. M. and Tyrrell, R. M. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblast by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 99-103.
14. Khansari, N., Shakiba, Y. and Mahmoudi, M. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **3**, 73-80.
15. Kim, B. R., Lee, J. S., Kim, D. Y., Kim, B. K., Lee, H. S., Lee, S. W. and Kwon, H. J. 2015. Antioxidant and antibacterial activities of the bark of *Fraxinus rhynchophylla* Hance. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **13**, 339-344.
16. Kim, K. H., Kang, I. K., Kang, E. J., Yang, E. K. and Park, S. N. 2004. A research trend of natural product on well-being industry. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **30**, 329-343.
17. Kshirsagar, R. and Upadhyay, S. 2009. Free radical scavenging activity screening of medicinal plants from Tripura, Northeast India. *Nat. Prod. Reposit.* **8**, 117-122.
18. Kundu, J. K. and Surh, Y. J. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* **659**, 15-30.
19. Lee, M. S. 2004. Looking at 'Well-Being' in terms of lifestyle: Healthy or trendy? *Kor. Liv. Sci. Assoc.* **13**, 477-484.
20. Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L. and Choi, M. K. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 5375-5381.
21. Lee, S. O., Lee, H. J., Yu, M. H., Im, H. G. and Lee, I. S. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 233-240.
22. Li, J., Zhang, H., Huang, W., Qian, H. and Li, Y. 2012. TNF- α inhibitors with anti-oxidative stress activity from natural products. *Curr. Top Med. Chem.* **12**, 1408-1421.
23. Liu, W., Ogata, T., Sato, S., Unoura, K. and Onodera, J. 2001. Superoxide scavenging activities of sixty Chinese medicines determined by an ESR spin-trapping method using electro-generated superoxide. *Yakugaku Zasshi.* **121**, 265-270.
24. Lokendrajit, N., Indira, S., Swapana, N. and Singh, C. B. 2012. Antioxidant and antimicrobial activity of *Croton caudatus* Geisel. *Asian J. Chem.* **24**, 4418.
25. McKee, T. and McKee, J. R. 2002. *Biochemistry*. 3th ed. pp. 319-325, Prentice Hall, New York.
26. Mohd Shukri, M. A., Alan, C. and Site Noorzuraini, A. R. 2011. Polyphenols and antioxidant activities of selected traditional vegetables. *J. Trop. Agric. Food Sci.* **39**, 69-83.
27. Nath, R., Roy, S., De, B. and Choudhury, M. 2013. Anticancer and antioxidant activity of *Croton*: A review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **5**, 63-70.
28. Neeharika, V., Swetha, T., Humaira, F., Reddy, B. M. and Sama, V. 2012. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Croton Caudatus* leaves. *Indian Drugs* **49**, 23-28.
29. Nicoletti, M. 2012. Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 2-6.
30. Park, C. M., Park, J. Y., Noh, K. H., Shin, J. H. and Song, Y. S. 2011. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF- κ B modulation in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **133**, 834-842.
31. Paul, S. B. and Devi, S. S. 2012. Antimicrobial activity of stem bark of *Phyllanthus acidus* (L) Skeels and root bark of *Croton caudatus* Geiseler. *J. Pure Appl. Microbiol.* **6**, 2017-2024.
32. Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**, 17-34.
33. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603-1616.
34. Saw, C. L., Wu, Q., Su, Z. Y., Wang, H., Yang, Y., Xu, X., Huang, Y., Khor, T. O. and Kong, A. T. 2013. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammation. *Biopharm. Drug Dispos.* **34**, 303-311.
35. Shan, Y., Lambrecht, R. W., Donohue, S. E. and Bonkovsky, H. L. 2006. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* **20**, 2651-2653.
36. Shin, D. C., Kim, G. C., Song, S. Y., Kim, H. J., Yang, J. C. and Kim, B. A. 2013. Antioxidant and antiaging activities of complex supercritical fluid extracts from *Dendropanax moribifera*, corni fructus and lycii fructus. *Kor. J. Herbology* **28**, 95-100.
37. Su, Z. Y., Shu, L., Khor, T. O., Lee, J. H., Fuentes, F. and Kong, A. N. 2013. A perspective on dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: oxidative stress, nrf2, and epigenomics. *Top Curr. Chem.* **329**, 133-162.
38. Takashi, O., Takashi, M., Takashi, K., Thaworn, K., Nobuo, K., Yukihiro, G. and Masami, I. 2008. Acylated triterpenoid saponins from *Schima noronhae* and their cell growth inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* **71**, 918-921.
39. Taketani, S., Kohno, H., Yoshinaga, T. and Tokunaga, R. 1989. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett.* **245**, 173-176.
40. Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid, R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **61**, 748-755.
41. Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R. K., Chen, J. and Zhang, F. 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **100**, 30-47.

초록 : *Apios fortunei*, *Colubrina arborescens*, *Croton caudatus*, *Osmanthus matsumuranus*, 그리고 *Schima noronhae*를 포함하는 5종 식물 추출물의 항산화 활성

이수현¹ · 진경숙¹ · 권현주^{1,2} · 김병우^{1,2*}

(¹동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터, ²동의대학교 공과대학 바이오응용공학부)

본 연구에서는 식물자원으로부터 생리활성을 보유한 새로운 기능성 소재를 찾고자 하였다. 이를 위해 수종의 식물 추출물을 분석하여 강한 항산화능을 보유한 5종(*Apios fortunei* Maxim., *Colubrina arborescens* Sarg., *Croton caudatus* Geiseler, *Osmanthus matsumuranus* Hayata 그리고 *Schima noronhae* Reinw.)을 선별하고, 각 추출물의 항산화 활성을 시험관 분석법, 세포실험 모델계, 대상 단백질 발현 분석 등을 통해 평가하였다. 먼저 각 추출물의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능을 통해 분석한 결과 모두 양성 대조군으로 사용한 아스코르빈산과 유사한 정도의 높은 활성을 보여 각 소재가 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 또한 RAW 264.7 세포주에서 H₂O₂에 의해 유도된 ROS에 대한 각 추출물의 소거능을 분석한 결과에서도 농도의존적인 강한 소거능을 보였다. 뿐만 아니라 대표적인 항산화효소 중 하나로 항산화능 보유 천연물에 의해 발현이 유도되는 HO-1 및 그 전사인자인 Nrf2의 단백질 발현이 각 추출물의 처리에 의해 증가됨을 보였다. 이러한 결과를 통해 5종 식물 추출물의 강한 항산화 활성을 처음으로 확인하였으며 향후 기능성 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.