

심황색소의 감광활성과 빛 조사에 의한 지질산화 및 세포독성 유도 효과

김희정¹ · 홍정일^{1,*}

¹서울여자대학교 자연과학대학 식품응용시스템학부

Induction of lipid peroxidation and melanoma cell death by turmeric oleoresin through its photosensitizing properties

Hee Jeong Kim¹ and Jungil Hong^{1,*}

¹Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract Curcuminoids in turmeric oleoresin (TO) are known to be effective antioxidants; they exhibit photosensitizing properties under light. In this study, the photoreactive properties of TO and its consequent induction of lipid peroxidation and cytotoxicity were evaluated. TO exhibited photosensitizing activities as evidenced by the reduction of nitro blue tetrazolium and by the decolorization of formazan under light, whereas light-irradiated TO did not enhance the levels of reactive oxygen species. The levels of hydroperoxide and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) were significantly elevated under a fluorescent light (10 W/m²) in corn, canola, and soybean oils containing 10-40 and 20-80 µg/mL of TO ($p < 0.05$) but not in olive oil. Canola oil was the most sensitive to photo-oxidation induced by TO. The level of TBARS from linoleic acid in the oil in water system was, however, decreased by TO under light. The cytotoxicity effect of TO on melanoma cells was also substantially enhanced under light.

Keywords: turmeric oleoresin, photosensitivity, photo-oxidation, lipid oxidation, cytotoxicity

서 론

심황색소(Turmeric oleoresin)는 울금이라고도 불리는 심황(*Curcuma longa* Linné)의 건조근경에서 유래한 천연색소이다. 심황색소는 남아시아 및 중동에서 요리의 향신료로 널리 사용되어 왔으며, 식품 산업에서 착색료로서는 물론 화장품, 의약품 등의 다양한 산업 분야에서도 널리 활용되고 있다(Awolu와 Oladeji, 2021). Curcuminoid는 심황색소의 주요 황색 색소 성분으로, β -diketone 공통구조를 지닌 curcumin과 demethoxycurcumin (DMC), bisdemethoxycurcumin (BMC) 등이 포함된다(Amalraj 등, 2017). Curcuminoid는 쥐의 뇌와 간 조직에서 유래한 지질의 과산화 억제제를 비롯하여 항산화, 항염증, 항암, 상처 회복, 신경 보호 효과 등의 다양한 생리활성을 가진다고 보고되었다(Mahmood 등, 2015; Rao, 1994; Zhang 등, 2015).

심황색소의 빛에 대한 반응성 연구도 진행되고 있는데, 형광등 빛 조사 하에 심황색소의 광안정성과 색도가 감소되었으며(Jung과 Hong, 2021), curcuminoid의 광분해는 페놀기 또는 메톡실기보다는, β -diketone 구조의 분해가 주요 원인이라고 보고되었다(Peram 등, 2017). 한편, 빛에 의해 감작되는 감광활성 물질을 이용한 광역학치료(Photodynamic therapy, PDT)가 뇌종양을 포함한

위장관, 호흡기, 생식기, 피부 등에서의 종양 및 암치료에 응용되고 있다(Szlasa 등, 2020). PDT에서 활용되고 있는 감광제는 먼저 표적 부위에 축적되고, 이후 가해지는 빛 에너지를 흡수하여 직접 라디칼화 되거나 일중항산소를 생성하는 등의 광화학반응을 통해 암세포, 병원성 미생물 및 표적 조직을 파괴할 수 있다(Abrahamse와 Hamblin, 2016; Kwiatkowski 등, 2018). Curcumin도 빛 조사에 의해 흑색종에 대한 세포 사멸효과를 증대시키며(Szlasa 등, 2020), 특히 청색광(420-480 nm)에 의해 효과적으로 광활성화가 일어나, vanillin, ferulic aldehyde, ferulic acid, vanillic acid 등의 산물로 광분해 된다고 보고되었다(Jankun 등, 2016). 또한 청색광 조사 하에 식품 내 다양한 박테리아 수를 감소시키는 curcumin의 항미생물 효과에 관한 연구도 보고된 바 있다(Wang 등, 2021).

감광성은 빛 에너지를 흡수한 감광제로부터 분자상 산소에 에너지 전달이 일어나면서 일중항산소가 생성되고 이에 의해 연쇄적인 산화반응을 유발하는 type II 반응과, 광활성화된 감광제의 에너지에 의해 먼저 기질을 라디칼화 하고 이어지는 반응을 통해 활성산소종을 포함한 다양한 산화유도물질이 생성되는 type I 기작을 통해 나타난다(Abrahamse와 Hamblin, 2016). 이러한 감광활성 성분은 식품의 산패를 비롯한 품질저하를 초래할 수 있으며 특히 유지류 등에 큰 영향을 미친다. 감광제에 의한 지질산화는 생성된 일중항산소가 불포화지방과 결합하면서 유발된다고 보고된 바 있으며(Min과 Boff, 2002), curcumin 역시 빛 조사 하에 식용유지에서 지질산화를 촉진시키는 감광제로 작용한다고 보고되었다(Yi 등, 2015).

지금까지 curcumin의 감광성 관련 연구는 많이 보고되었으나, curcumin 단일성분에 집중되어 실제 식품산업에 널리 활용되는 심황색소의 감광활성과 이로 인한 영향을 확인하는 연구는 거의

*Corresponding author: Jungil Hong, Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea
Tel: +82-2-970-5639
Fax: +82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received November 22, 2021; revised February 3, 2022;
accepted February 3, 2022

진행된 바 없다. 또한, 자외선이나 청색광 등 특수광 조사 하에서의 curcumin의 감광성 관련 연구가 많이 진행된 것에 비해, 형광등과 같은 일상 조명 하에서의 연구는 대단히 제한적이다. 따라서 본 연구에서는 일상 조명에 사용되는 형광등 빛 조사에 의한 심황색소의 감광활성을 평가하고, 감광활성 발현에 의한 산패 유발 효과를 옥수수유, 카놀라유, 대두유, 올리브유 등 대표적인 4종의 식용유지에서 비교하였으며, B16F10 흑색종 세포에 대한 광독성 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 세포주

본 연구에 사용된 올레오레진 심황색소(turmeric oleoresin, curcuminoids 40%)는 ES기술연구소(Gunpo, Korea)로부터 구입하고, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 100 mg/mL 농도로 분주하여 -80°C 에 보관하였다. 카놀라유, 대두유, 올리브유(CJ Cheiljedang Co., Seoul, Korea)와 옥수수유(Sajo Haepyoo Co., Seoul, Korea)는 시중 마트에서 구입하였다. Ammonium ferrous sulfate (AFS)는 Showa Co. (Tokyo, Japan)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Amresco Inc. (Solon, OH, USA)에서, methionine은 Ajinomoto Co. (Tokyo, Japan)에서 구매하였다. 실험에 사용한 세포주 B16F10은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 10% 우태아혈청, 100 unit/mL penicillin과 0.1 mg/mL streptomycin을 첨가하여 95% 습도와 5% CO_2 가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 기타 실험에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

심황색소의 감광활성 측정

우선, 심황색소의 감광활성을 nitro blue tetrazolium (NBT) chloride를 이용하여 평가하였다(Lee와 Hong, 2022; Yang 등, 2017). 심황색소를 증류수에 희석한 용액 50 μL 와 100 mM phosphate buffer (pH 7.8)에 희석한 NBT 및 methionine 용액 50 μL 를 혼합하여 NBT와 methionine의 최종농도가 각각 160 μM , 10 mM이 되도록 하였다. 이를 암소 또는 10 W/m^2 형광등(FPL27EX-D, 27W, Aris Co., Seoul, Korea) 조사 하에 상온에서 24시간 반응시킨 후, 1 N NaOH 100 μL 를 가해 560 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 판독기(Spectra Max M2, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. Formazan을 이용한 감광활성 측정을 위하여, DMSO에 용해한 250 μM MTT formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) 또는 320 μM TTC formazan (1,3,5-triphenyltetrazolium formazan) 80 μL 와 서로 다른 농도로 DMSO에 희석한 심황색소 80 μL 를 반응시켰다. 그리고 암소 또는 형광등 조사($2.5, 5, 10\text{ W/m}^2$) 조건에서 24시간 동안 formazan의 탈색변화를 각각 500, 490 nm에서 마이크로 플레이트 판독기(Spectra Max M2)를 이용하여 측정하였으며, erythrosine B (EB)를 양성대조군으로 사용하였다(Hong 등, 2018; Kang, 2021).

심황색소의 활성산소종에 대한 영향 분석

빛 조사 시 심황색소의 활성산소종에 대한 영향은 Kang(2021)의 방법을 사용하여 분석하였다. HCT 116 (80-90% confluency in 100 ϕ dish) 세포에 25 μM 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate

(DCFH-DA)를 처리하여 37°C 에서 2시간 반응시킨 후 세포배양액을 걷어내고, ice-cold phosphate buffered saline으로 세포를 세척한 후 dish 당 1 mL DMSO 용액을 가하여 cell lysate를 제조하였다. 이 cell lysate를 10배 희석한 DCFH 용액 50 μL 와 농도를 달리하여 증류수에 희석한 심황색소 또는 EB 50 μL 를 혼합하고 암소 및 10 W/m^2 형광등 조사 하에 240분간 반응시켰다. 각 시간별 형광의 변화를 emission 535 nm와 excitation 485 nm에서 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max M2)를 이용하여 측정하였다.

식용유지 산화유도 분석

심황색소에 의한 식용유지의 산화유도 활성은 유지 중의 hydroperoxide 양과 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 양으로 분석하였다. 우선 농도를 달리한 심황색소 DMSO 용액을 식용유지에 0.1% (v/v)로 분산시켜 암소 및 10 W/m^2 형광등 조사 하에 1시간 노출시킨 후, 생성된 lipid hydroperoxide의 양을 ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay로 분석하였다. 각 시료 20 μL 에 FOX working solution [2.5 mM xylenol orange, 6 mM AFS 및 5 mM butylated hydroxytoluene (BHT) (1:1:18, v/v/v)] 160 μL 를 가해 상온 암소에서 30분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 조건으로 암소 및 명소 조건 하에 4시간 반응시킨 시료 용액 180 μL 에 1 M trichloroacetic acid 90 μL , 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 90 μL 및 5% BHT 15 μL 를 혼합한 후, MB-102 mixing block (Bioer Technology, Hangzhou, China)을 이용하여 1,500 rpm, 25°C 에서 10분간 교반하였다. 이를 $97\text{-}100^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 발색시키고 ice에서 10분간 방치한 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리(Mini, Gyrozen Co., Gimpo, Korea) 하여 수용액상의 TBARS의 양을 532 nm에서 마이크로플레이트 판독기(Spectra Max M2)로 측정하였다.

Oil in water (O/W) 반응계에서의 지질과산화 유도 측정

Linoleic acid를 이용한 O/W 반응계는 linoleic acid를 sodium dodecyl sulfate (SDS)에 분산시켜 제조하였다. Linoleic acid를 0.4% 농도로 0.4% SDS에 분산시킨 O/W 기질에 각 농도별로 0.4% SDS에 희석한 심황색소를 혼합하여 암소 및 10 W/m^2 형광등 조사 하에 1시간 노출시켰다. 생성된 hydroperoxide의 양은 400 μM xylenol orange, 800 mM D-sorbitol 및 1 mM AFS (1:1:2, v/v/v) 비율로 제조한 FOX reagent를 이용하여 550nm에서 분석하였다. 또한, 0.4% SDS에 희석한 0.4% linoleic acid 60 μL 와 농도를 달리하여 0.4% SDS 용액에 희석한 심황색소 용액 60 μL 를 혼합한 후, 암소 및 10 W/m^2 형광등 조사 조건 하에 2시간 반응시켰다. 이 반응액에 생성된 TBARS의 양을 위에 기술한 방법으로 측정하였다.

세포독성 측정

B16F10 세포를 96-well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후, 우태아혈청과 phenol red가 포함되지 않은 DMEM 배지(1% DMSO)에 농도별로 심황색소를 처리하고, 37°C 배양기에서 암소 또는 5 W/m^2 형광등 조사 하에 1시간 노출시켰다. 이후 빛을 조사한 배지를 제거하고 10% 우태아혈청을 함유한 배지로 변경하거나 또는 배지를 변경하지 않고 24시간 추가로 배양하였다. 이후 0.5 mg/mL MTT를 용해한 배지로 교체하여 45분간 37°C 에서 세포를 처리한 후, MTT 용액은 제거하고 100 μL DMSO로 세포 내 생성된 formazan을 용해하여 550 nm에서 측정하였다.

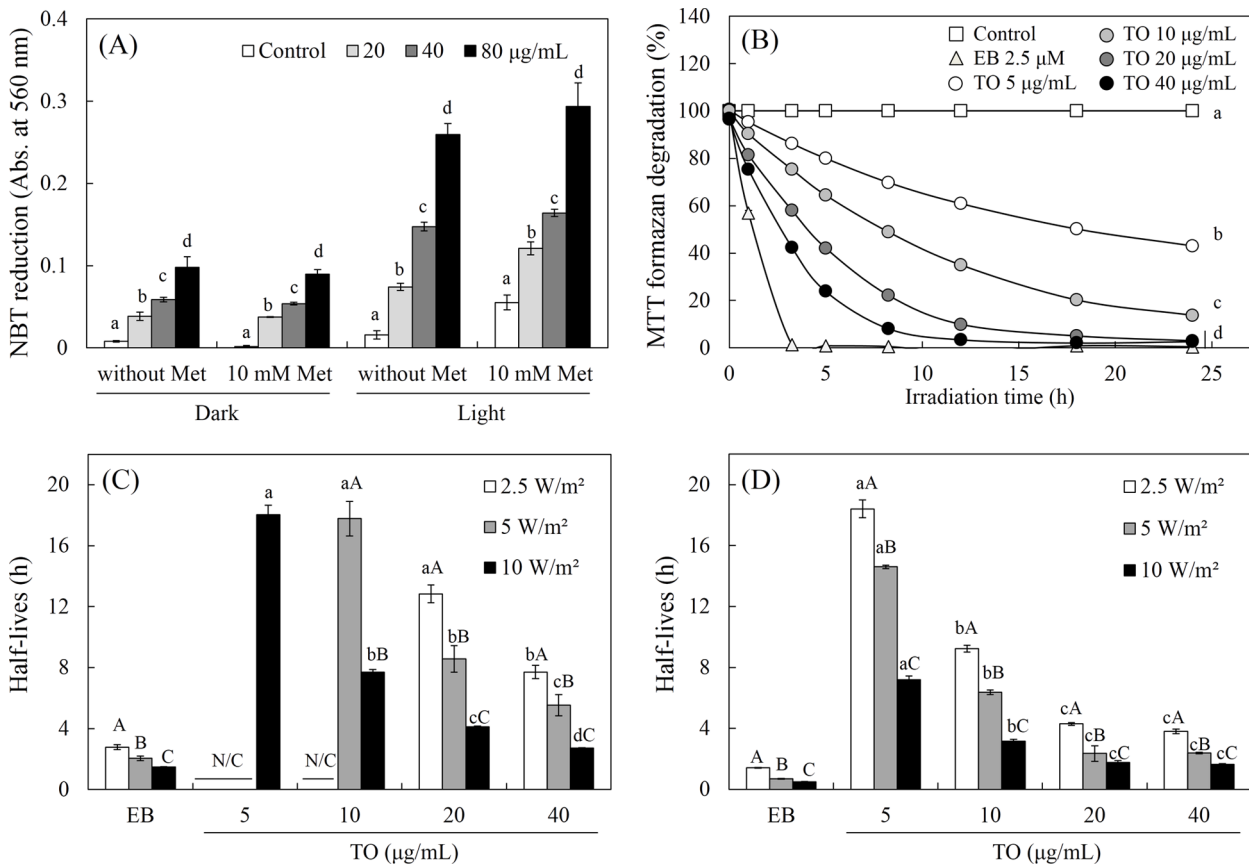


Fig. 1. Evaluation of photo-reactivity of TO based on the abilities of NBT reduction and formazan decolorization. Different concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of TO were incubated with NBT in the absence or presence of methionine under 10 W/m^2 light or in a dark during 24 h at 25°C (A). TO and EB were incubated with MTT formazan under 10 W/m^2 light for 24 h (B). Half-life (a period that requires 50% formazan degradation) changes of MTT (C) and TTC (D) formazan by TO under 2.5, 5, and 10 W/m^2 lights were calculated. Each value represents the mean \pm SD ($n=3$). Different lowercase (A-D) and uppercase (C and D) letters indicate significant difference among different concentrations and different light intensity, respectively ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test. N/C; not calculated.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 평균 \pm 표준편차로 나타냈고, 각 실험군별 유의차 분석은 Student's *t*-test 또는 One-way analysis of variance (ANOVA)와 Tukey's honestly significant difference (HSD) test (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 실시하여 95와 99%의 유의수준에서 검정하였다. 세포독성에 대한 IC_{50} 값은 각 결과로부터 직선부위에 대한 선형회귀식을 구하고 50% 세포사멸을 일으키는 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

심황색소의 감광활성 측정

심황색소의 광감각활성 평가를 위해 암소와 명소에서 methionine의 유무에 따른 NBT 환원능을 측정하였다. 상온의 조건에서 암소 및 빛 조사 하에 24시간 동안 반응시킨 결과, 암소 조건과 비교하였을 때, 10 W/m^2 빛 조사 하에 심황색소 농도에 따른 NBT 환원의 유의적인 변화가 관찰되었다(Fig. 1A). 이 때 심황색소에 의한 NBT 환원은 methionine의 존재 여부와 관계없이 유사한 정도로 진행되었으며, 따라서 methionine과 같은 전자공여체는 심황색소에 의한 NBT 환원에 크게 관여하지 않는 것으로 사료된다. 선행연구에서 riboflavin과 같은 감광성분이 빛 조사 하에 methionine 등의 아미노산 의존적으로 NBT를 환원시키는 현상을

보고하였는데(Yang 등, 2017), 심황색소는 빛에 의해 활성화되어 직접 NBT와 반응하고 환원을 유도하는 것으로 판단된다.

한편, 다양한 감광제들에 빛 조사 시 MTT 또는 TTC formazan의 탈색을 유도한다는 보고(Kang, 2021)에 근거하여, 각 formazan과 농도를 달리한 심황색소를 혼합하여, 서로 다른 광도의 형광등 빛 조사 하에서 반응시켰다. 그 결과, 24시간 동안 10 W/m^2 빛 조사 하에 양성대조군으로 사용된 $2.5 \mu\text{M}$ EB를 포함하여 심황색소의 농도와 시간에 따른 유의적인 MTT formazan의 탈색이 유도되었다(Fig. 1B). 이 현상은 MTT와 TTC formazan에서 모두 관찰되었으며, 감광활성 비교를 위해 서로 다른 농도 및 조사 광도에서 formazan을 50% 탈색시키는 시간(half-life)을 산출한 결과, EB와 심황색소에서 농도와 조도의 증가에 따른 유의적인 half-life의 감소경향을 보였다(Fig. 1C, D). 특히 TTC formazan이 심황색소의 감광활성에 더 민감하게 반응하여 MTT formazan보다 신속한 탈색반응이 유도되었다. 따라서 모든 실험조건에서 24시간 내에 50% 이상의 탈색반응을 보인 TTC formazan 결과를 통해, MTT formazan 결과에서 산출할 수 없었던 2.5 W/m^2 와 5 W/m^2 의 낮은 광도 하에서의 저농도 심황색소의 감광활성에 의한 half-life 값도 계산할 수 있었다(Fig. 1D). 한편, 암소 조건에서는 $2.5 \mu\text{M}$ EB나 $40 \mu\text{g/mL}$ 심황색소에 의해서 24시간 동안 MTT formazan의 색도 변화가 나타나지 않았으며, TTC formazan에서도 5% 이내의 탈색만이 일어났다(data not shown). 이상의 결과

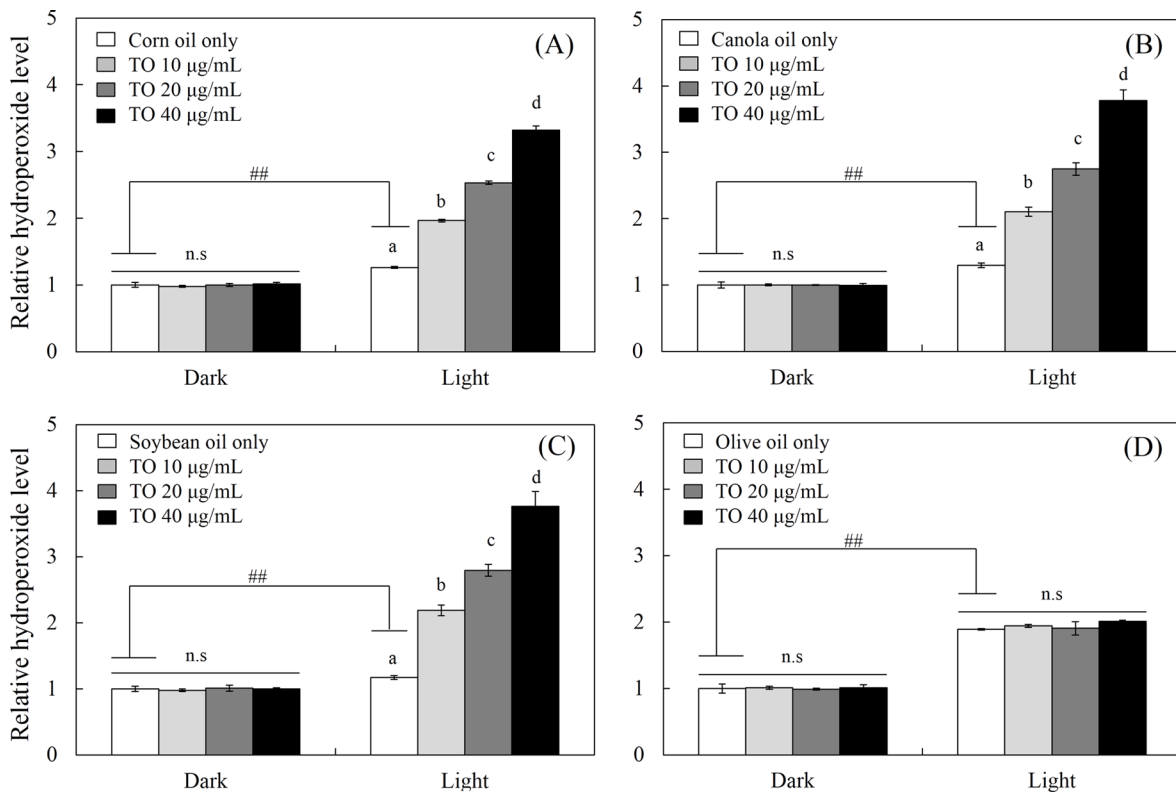


Fig. 2. Hydroperoxide level formed in commercial oils containing TO by light irradiation. Hydroperoxide level was analyzed in corn oil (A), canola oil (B), soybean oil (C), and olive oil (D) containing 10-40 µg/mL TO after irradiation of 10 W/m² light or in a dark for 1 h. Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference (p<0.05) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test. n.s.; not significant. ## significantly different between dark and light control according to Student's t-test (##p<0.01)

는 심황색소가 농도와 빛 조사 광도에 비례하는 NBT의 환원반응과 formazan의 탈색반응을 유도함으로써, 빛에 의해 활성화되는 광감각 특성이 있음을 의미한다.

빛 조사 시 심황색소에 의한 식용유지의 산화유도

광활성을 가진 성분들은 산화에 민감한 유지 등의 산패를 유도할 수 있음이 보고된 바(Min과 Boff, 2002; Yi 등, 2015), 형광등 조사 하에 각종 식용유지에 미치는 심황색소의 영향을 조사하였다. 우선 심황색소가 포함된 옥수수유, 카놀라유, 대두유 및 올리브유 등 4종의 유지에 빛을 조사한 후, 생성된 hydroperoxide의 양을 FOX assay를 통해 비교하였다. 암소 및 10 W/m² 형광등 조사 조건에서 1시간 동안 반응시킨 결과, 옥수수유, 카놀라유 및 대두유에서 심황색소의 농도에 유의적인 hydroperoxide의 증가가 관찰되었고, 암소 조건에서는 이와 같은 현상이 나타나지 않았다(Fig. 2A, B, C). 올리브유의 경우에는 10 W/m² 형광등 조사조건에서 심황색소 함유 여부에 관계없이 암소에 비해 hydroperoxide 수준이 2배 가까이 증가하였으며, 심황색소 농도에 따른 유의적 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2D). 올리브유는 빛 자체에 의해서도 산화반응이 크게 일어났는데, 이 결과는 올리브유에 함유되어 있는 클로로필류의 광분해산물로 인해 대두유보다도 빛에 의한 산화안정성이 낮다는 이전 보고와 일치한다(Moon 등, 2005).

심황색소 40 µg/mL를 처리한 카놀라유와 대두유에서 암소 대조군 대비 hydroperoxide 수준이 각각 3.78과 3.77배 증가하여 높은 산화도를 나타냈으며, 옥수수유에서 3.32배의 증가 정도를 나

타냈다. 일반적으로 카놀라유는 불포화지방산 함량이 높고, 대두유는 특히 산화에 민감한 다중불포화지방산의 함량이 매우 높은 것으로 보고되었다(Ryu 등, 2018). 따라서 심황색소에 의한 유지의 광산화 유도에서도 불포화지방산이 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

유지의 산화과정 중 hydroperoxide는 반응초기에 생성되는 반면, malondialdehyde 등의 산화분해 산물은 반응이 상당히 진행된 이후에 생성된다(Bacellar와 Baptista, 2019; Yi 등, 2018). 따라서 빛 조사 하에 심황색소에 의해 생성된 유지 중의 malondialdehyde 수준을 TBA와 반응하여 생성되는 TBARS 양으로 분석하였다. 암소 및 10 W/m² 빛 조사 조건에서 4시간 반응시켰을 때, 암소에서는 심황색소에 의한 변화가 일어나지 않았으나, 빛 조사에 의해서는 올리브유를 제외한 3종의 식용유지에서 암소 대조군에 비해 TBARS 양이 유의적으로 증가하였다(Fig. 3). 특히 카놀라유가 가장 민감하여 암소 대조군에 비해 심황색소 80 µg/mL 처리군에서 TBARS 양이 3배 이상 증가하였다(Fig. 3B). 카놀라유는 다중불포화지방산의 함량이 대두유나 옥수수유에 비해 상대적으로 낮지만, 포화지방산의 함량 또한 매우 낮다. 한편, 단일불포화지방산의 함량이 월등하게 높으면서, 포화지방산의 함량도 비교적 높은 올리브유에서는 심황색소에 의한 농도 유의적인 TBARS 양의 증가 경향이 나타나지 않았다(Fig. 3D). 따라서 초기산화 반응과는 달리 포화지방산의 함량이 심황색소에 의한 전체적인 유지산화 속도에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 추후 유지의 조성 및 광산화도의 분석을 위한 더 자세한 연구가 필요할 것으로 보인다.

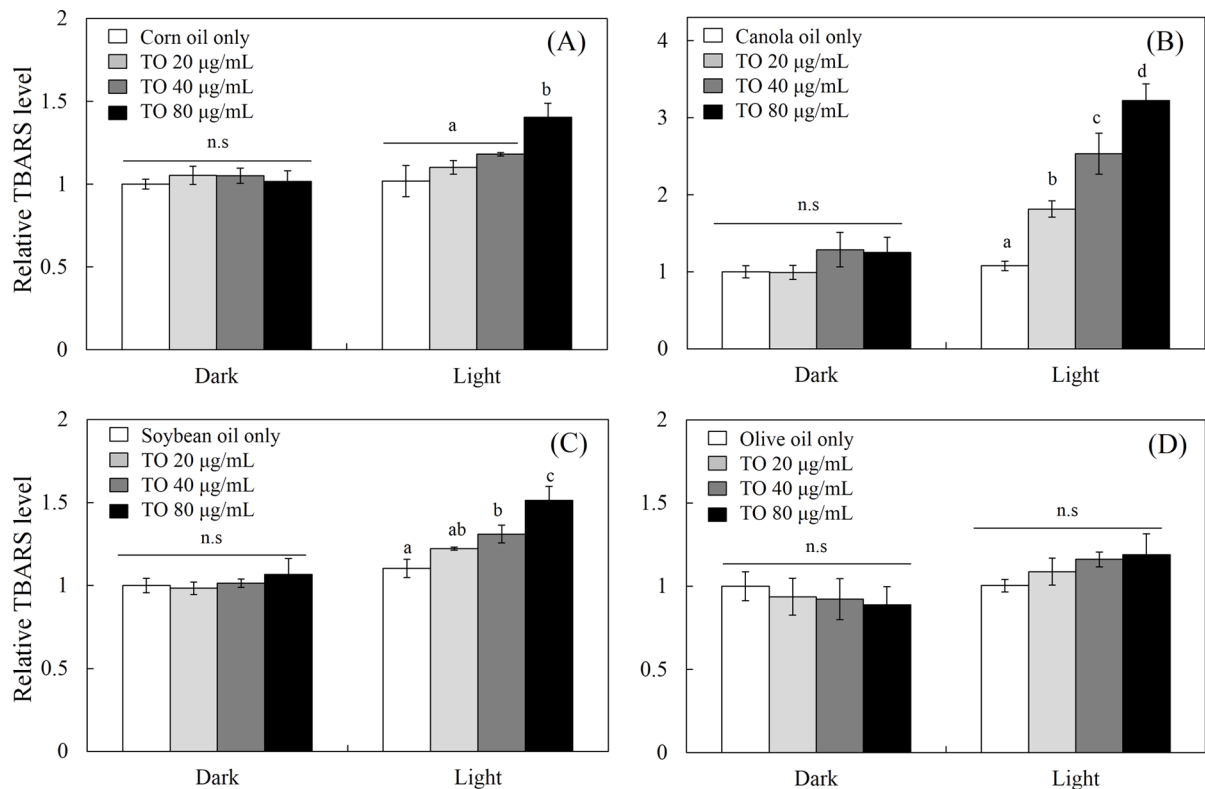


Fig. 3. Effects of TO on TBARS formation in commercial oils under light. TBARS level in corn oil (A), canola oil (B), soybean oil (C), and olive oil (D) containing TO was analyzed after 4 h irradiation of 10 W/m² light or in a dark. Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference (*p*<0.05) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test. n.s.; not significant.

Oil in water (O/W) system에서 심황색소의 영향

Linoleic acid와 SDS를 이용한 O/W 시스템 상에서 심황색소의 광산화 유도 여부를 분석하였다. 우선, 10 W/m² 빛 조사에 의해 O/W 반응계에서 hydroperoxide 양이 심황색소 함유 농도에 따라 유의적으로 증가하였으며, 20 µg/mL 심황색소 존재 시 암소 대조군 대비 19% 증가하였다(Fig. 4A). 하지만, TBARS의 경우에는 심황색소 농도의존적으로 생성량이 감소하여, 빛 조사 환경에서도 심황색소에 의해 linoleic acid의 산화가 억제되는 경향을 나타냈다(Fig. 4B). 본 결과는 식용유지 상에 첨가된 심황색소가 빛 조사 하에 직접 지질과 반응하여 상당한 산화반응을 유발한 Fig. 2와 3의 결과와는 달리, O/W 시스템에서는 심황색소의 감광활성에 의한 지질 산화유도 효과가 미약하거나 오히려 억제되는 것을 보여준다. 본 실험에 사용된 심황색소(turmeric oleoresin)는 40% (w/w)의 curcuminoid를 함유하고 있으며, curcumin, DMC 및 BMC가 각각 61.0, 21.2, 및 17.8% (w/w)의 비율로 구성되어 있다(Jung과 Hong, 2021). 심황색소의 주요 성분으로서 소수성 성질을 나타내는 curcuminoid들은 O/W 반응계보다는 유지 반응계 상에서 지질과 더 효과적으로 호환되며, 빛 노출 시 직접 지질에 에너지를 전달해 산화를 유도하는 것으로 판단된다(Bacellar와 Baptista, 2019). 따라서, 빛에 의해 활성화된 성분과 기질의 직접적 반응이 우선적으로 일어나는 Type I 감광반응이 심황색소에 의한 주요 광산화 기작으로 예상된다.

빛 조사 하에 심황색소의 ROS에 대한 영향

심황색소 성분들은 ROS를 비롯한 다양한 라디칼에 대한 소거활성을 가지는 산화방지 활성이 보고되었다(Song 등, 2018). 일

반적으로 감광성분은 빛 조사 시 1차적 또는 2차적으로 주변의 산소분자와 반응하여 ROS를 생성하는데, 빛 조사 하에서 심황색소가 감광활성을 통해 ROS를 생성하는지 아니면 여전히 소거활성을 통한 산화방지 활성을 발현하는지에 대해 조사하였다. 본 실험에서는 DCFH-DA를 세포에 처리해 얻은 cell lysate 중의 DCFH probe를 사용하여, 감광성분에 대한 빛 조사에 의해 발생하는 ROS 수준을 측정하였다. 형광등 10 W/m² 조사 조건으로 1.25 µM DCFH와 양성대조군인 EB 또는 심황색소를 반응시킨 결과, EB는 신속하게 과량의 ROS를 생성하면서 DCF형광을 증가시킨 반면, 심황색소 처리군에서는 대조군의 빛 조사 만을 통해 생성되는 ROS에 의한 기본 형광 값 증가에 대해서도 농도 의존적이고 유의적인 감소를 유도하였다(Fig. 5A). 그러나 암소 조건 하에서는 초기 형광값과 비교하여 240분 뒤에도 유의미한 형광값의 변화를 보이지 않았다(Fig. 5B).

본 결과는 심황색소가 빛 조사 하에서도 여전히 ROS에 대한 소거활성과 산화방지 활성을 지니고 있으며, 빛에 의해 감작된 심황색소 성분도 일중항산소 및 활성산소종 생성을 유도하고 이에 의해 산화가 유발되는 Type II 감광반응에서는 오히려 저해활성을 나타낼 수 있음을 의미한다. 이러한 현상은 또한 O/W 시스템 상에서 빛 조사 시에도 linoleic acid의 산화를 방지하는 Fig. 4B의 결과로도 설명될 수 있다. 따라서 심황색소의 감광활성은 감광체가 받은 빛 에너지를 일차적으로 주변의 산소에 전달해 일중항산소를 생성하고 이로 인한 연쇄적인 산화가 촉발되는 Type II 기작 보다는, 주변의 다른 기질분자와 우선적으로 반응하는 Type I 기작에 의해 발현되는 것으로 판단된다.

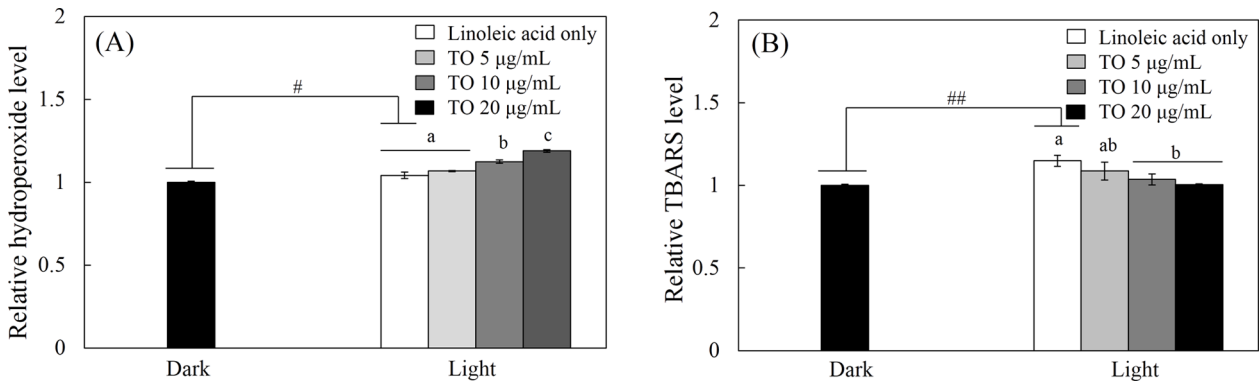


Fig. 4. Effects of TO on lipid peroxidation in linoleic acid/SDS (O/W) system under light. Levels of hydroperoxide (A) and TBARS (B) in linoleic acid/SDS (0.2/0.4%) emulsion system containing TO were analyzed after 1 h (A) or 2 h (B) irradiation of 10 W/m² light or in a dark. Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test. #, ## significantly different between dark and light control according to Student's t-test ($^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$)

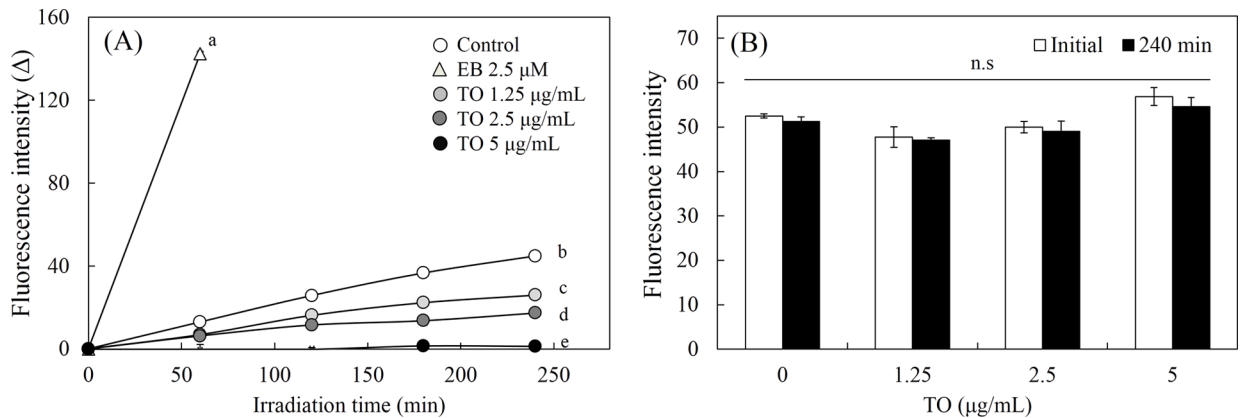


Fig. 5. Effects of TO on DCF fluorescence under light. DCFH mixed with different concentrations of TO or EB was incubated under 10 W/m² light during 240 min (A). Changes in DCF fluorescence in a dark were also analyzed (B). Each value represents the mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test. n.s.; not significant.

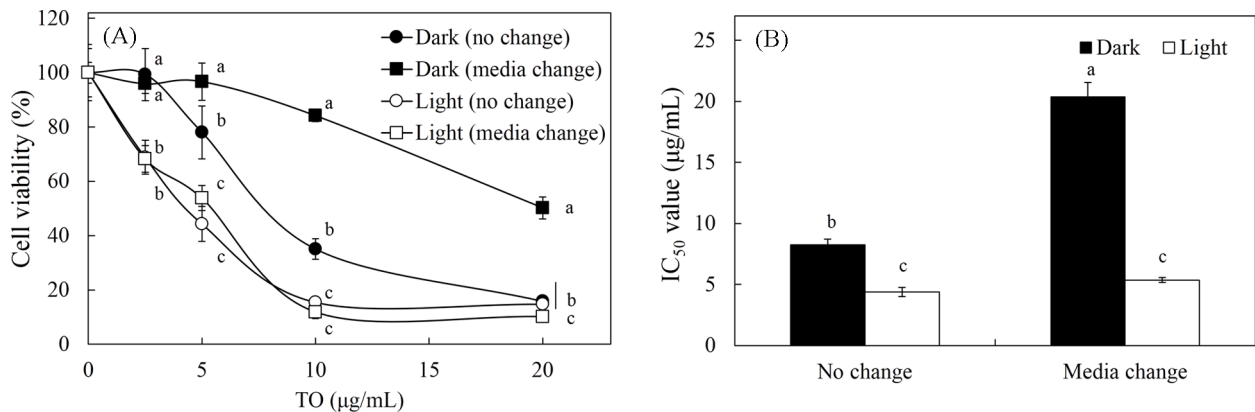


Fig. 6. Changes in cytotoxic effects of TO on melanoma cells by light irradiation. B16F10 cells were treated with different concentrations of TO and incubated under 5 W/m² light or a dark at 37°C, 5% CO₂ for 1 h. The cells were then further incubated for 24 h with or without changing media, and the cell viability was analyzed using the MTT assay (A). IC₅₀ values were also calculated (B). Each value represents the mean±SD (n=6). Different letters indicate significant difference ($p<0.05$) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

흑색종 세포주에 대한 심황색소의 영향

B16F10은 쥐 유래의 흑색종 세포로서, 본 실험에서 광활성화 성분인 빛 처리를 병행하는 PDT 대상 모델로 사용하였다. 이에 심황색소 처리한 후 빛 조사를 통해 B16F10 흑색종의 성장과 사

멸에 미치는 영향을 평가하였다. 심황색소를 농도 별로 세포에 처리하고 1시간 동안 5 W/m² 형광등 빛 조사를 진행한 후, 배지를 변경하지 않고 24시간 방치하여 세포사멸에 미치는 영향 및 serum을 함유한 새 배지로 변경하고 24시간 추가 배양하여 처리

이후의 세포성장 정도를 평가하였다(Fig. 6A). 그 결과, 빛 처리 없이도 농도 의존적인 심황색소의 세포독성이 발현되었으며, 배지를 교체하지 않고 24시간 연속 처리한 세포에서 현저한 세포독성이 발현되었다. 심황색소의 흑색종에 대한 세포독성은 1시간 빛 처리에 의해서 유의적으로 강화되었는데, 각 처리군에 대한 IC₅₀ 값을 계산한 결과, 배지를 변경하지 않은 경우 빛 처리에 의해 8.26에서 4.39 µg/mL로 세포독성이 증가하였으며, 배지를 변경해준 경우 20.4에서 5.37 µg/mL로 4배 가까이 세포독성 강화 현상이 나타났다(Fig. 6B). 이는 가시광선 빛에 의해 curcumin이 인간 피부암 세포에 세포독성을 나타낸다는 선행 보고(Buss 등, 2013)와 같이, 심황색소 또한 유사한 활성을 발현하는 것을 보여준다. 흥미롭게도 심황색소를 처리하고 빛을 조사한 세포군에서는 배지교체 여부에 관계없이 유사한 세포독성이 관찰되었는데, 이는 전체적인 심황색소 처리시간 보다는 심황색소와 빛에 노출된 시간이 세포 사멸에 결정적으로 작용하며 대부분의 세포 사멸유도가 이 때 일어나는 것을 의미한다. 따라서 curcumin 외에도 심황색소나 curcumin, DMC 및 BMC의 curcuminoid 혼합성분들도 효과적인 PDT제제로서 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

요약

본 연구에서는 형광등 빛 조사 하에서 심황색소의 감광활성을 평가하고 이로 인한 유지산화 유도 및 세포독성 강화 효과를 평가하였다. Formazan 탈색 및 NBT 환원을 이용한 실험에서 심황색소는 빛에 노출 시 유의적인 감광활성을 보였다. 또한, 심황색소는 빛 조사에 의해 올리브유를 제외한 옥수수유, 카놀라유와 대두유 등 식용유지에서 hydroperoxide 양과 TBARS 양을 현저하게 증가시켰다. 그러나, 심황색소는 빛 조사 하에서 O/W 반응계에서 linoleic acid로부터 TBARS의 생성을 저해했으며, ROS에 의한 DCF 형광반응도 감소시키는 산화방지 효과를 나타냈다. 또한 심황색소의 흑색종에 대한 세포독성도 형광등 빛 조사에 의해 현저하게 강화되었다. 본 연구결과는 식품 첨가물로 사용되는 심황색소가 감광활성 발현을 통해 특정환경에서 유지산화를 유도하는 부정적 영향을 미칠 수 있으나, 암세포 사멸 효과강화 등의 긍정적인 활성을 나타낼 수 있음을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부 재원의 한국연구재단 중견 및 일반연구자 지원사업(NRF-2019R1A2C1089617와 NRF-2021R1F1A1051466)에 의해 수행되었음.

References

Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* 473: 347-364 (2016)
 Amalraj A, Pius A, Gopi S, Gopi S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives-A review. *J. Tradit. Complement. Med.* 7: 205-233 (2017)
 Awolu O, Oladeji O. Natural plant pigments and derivatives in functional foods developments. *Eurasian J. Food Sci. Technol.* 5: 25-40 (2021)
 Bacellar IOL, Baptista MS. Mechanisms of photosensitized lipid oxidation and membrane permeabilization. *ACS Omega* 4: 21636-21646 (2019)

Buss S, Dobra J, Goerg K, Hoffmann S, Kippenberger S, Kaufmann R, Hofmann M, Bernd A. Visible light is a better co-inducer of apoptosis for curcumin-treated human melanoma cells than UVA. *Plos One* 8: e79748 (2013)
 Hong J, Kang S, Jung YN. Formulation for measuring photosensitizing activity, and kit and method using same. Korea Patent 10-1850483 (2018)
 Jankun J, Wyganowska-Świątkowska M, Dettlaff K, Jelińska A, Surdacka A, Wątróbska-Świetlikowska D, Skrzypczak-Jankun E. Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation. *Int. J. Mol. Med.* 37: 1151-1158 (2016)
 Jung YN, Hong J. Changes in chemical properties and bioactivities of turmeric pigments by photo-degradation. *AIMS Agriculture and Food* 6: 754-767 (2021)
 Kang S. Development of a rapid and convenient method for evaluating photosensitizing activity using formazan dyes and effects of various solvent agents on bioactivities of curcuminoids. PhD thesis, Seoul Women's University, Seoul, Korea (2021)
 Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Sączko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy-mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* 106: 1098-1107 (2018)
 Lee E, Hong J. Reduction of nitro blue tetrazolium by combined reaction of various photosensitizers with amino acids. *Korean J. Food Sci. Technol.* 54: 1-7 (2022)
 Mahmood K, Zia KM, Zuber M, Salman M, Anjum MN. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 81: 877-890 (2015)
 Min DB, Boff JM. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 1: 58-72 (2002)
 Moon JS, Lee OH, Son JY. The oxidation stability of virgin and pure olive oil on autooxidation and thermal oxidation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 93-98 (2005)
 Peram MR, Jalalpure SS, Palkar MB, Diwan PV. Stability studies of pure and mixture form of curcuminoids by reverse phase-HPLC method under various experimental stress conditions. *Food Sci. Biotechnol.* 26: 591-602 (2017)
 Rao MNA. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 1013-1016 (1994)
 Ryu KY, Kim AG, Kim TS, Lee HH, Seo KW, Cho BS. Inhibition effect of herbs on the rancidity of soybean oil. *Korean J. Food Preserv.* 25: 36-43 (2018)
 Song ES, Kang S, Hong J. Changes in chemical properties, antioxidant activities, and cytotoxicity of turmeric pigments by thermal process. *Korean J. Food Sci. Technol.* 50: 21-27 (2018)
 Szlaza W, Supplitt S, Drag-Zalesińska M, Przystupski D, Kotowski K, Szweczyk A, Kasperkiewicz P, Sączko J, Kulbacka J. Effects of curcumin based PDT on the viability and the organization of actin in melanotic (A375) and amelanotic melanoma (C32)-in vitro studies. *Biomed. Pharmacother.* 132: 110883 (2020)
 Wang Z, Jia Y, Li W, Zhang M. Antimicrobial photodynamic inactivation with curcumin against *Staphylococcus saprophyticus*, in vitro and on fresh dough sheet. *LWT-Food Sci. Technol.* 147: 111567 (2021)
 Yang MY, Chang CJ, Chen LY. Blue light induced reactive oxygen species from flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide on lethality of HeLa cells. *J. Photoch. Photobio. B.* 173: 325-332 (2017)
 Yi B, Ka HJ, Kim MJ, Lee J. Effects of curcumin on the oxidative stability of oils depending on type of matrix, photosensitizers, and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 92: 685-691 (2015)
 Yi B, Kim MJ, Lee J. Lipid oxidation and antioxidant mechanisms in different matrix. *Food Sci. Ind.* 51: 127-135 (2018)
 Zhang YP, Li YQ, Lv YT, Wang JM. Effect of curcumin on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of human melanoma A375 cells. *Genet. Mol. Res.* 14: 1056-1067 (2015)