

산화스트레스가 유도된 HepG2 세포에서 Eriodictyol의 항산화 효과

주태우 · 홍성현 · 박선영 · 김거유 · 주진우
강원대학교 동물생명과학대학 축산식품과학전공

Antioxidant Effects of Eriodictyol on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells

Tae-Woo Joo, Sung-Hyun Hong, Sun-Young Park, Gur-Yoo Kim, and Jin-Woo Jhoo

Animal Products and Food Science Program, College of Animal Life Sciences, Kangwon National University

ABSTRACT This study was conducted to investigate the antioxidant and hepatoprotective effects of eriodictyol compound against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells by measuring expression levels of antioxidant enzymes, liver function index enzyme activities, and inhibitory effects against reactive oxygen species (ROS) production. HepG2 cell viability was assessed using 3-(4,5-dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay. In the concentration range of 10~50 µg/mL, eriodictyol displayed over 98% cell viability in HepG2 cells. The effects of increased gene expression on hydrogen peroxide-induced oxidative stress were analyzed by monitoring antioxidant enzyme (superoxide dismutase, SOD; catalase, CAT; glutathione peroxidase, GPx) gene expression levels using real-time PCR. Eriodictyol compound significantly increased gene expression levels of SOD, CAT, and GPx in a dose-dependent manner (10~50 µg/mL). Hepatoprotective effects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress were analyzed by monitoring glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), lactate dehydrogenase (LDH), and gamma-glutamyl transferase (GGT) activities in HepG2 cell culture medium using a biochemistry analyzer. Eriodictyol compound significantly reduced GOT, LDH, and GGT activities in a dose-dependent manner in HepG2 cells. ROS level in HepG2 cells was analyzed by 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence diacetate assay, and eriodictyol compound effectively reduced the intracellular ROS level in HepG2 cells. The results reveal that eriodictyol compound can be useful for development of effective antioxidant and hepatoprotective agents.

Key words: eriodictyol, antioxidant enzyme expression, hepatoprotective, flavonoid, antioxidant activity

서 론

생명체는 에너지대사를 위해 산소를 이용하지만 이는 에너지를 만드는 대사과정, 체내 효소계, 환원대사의 내적요인 및 외부인자로 인해 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen 등과 같은 반응성이 높은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 형성하게 된다(1). 활성산소종은 정상적인 환경에서 항상성을 유지하기 위한 산화 방어기작에 의해 제거되어 생체에 큰 영향을 미치지 않지만(2), 각종 물리화학적, 환경적, 또는 외적 요인에 의하여 생체 내 활성산소종의 생성과 이를 제거하는 항산화 반응 간의 불균형으로 인해 활성산소종이 증가한 상태인 산화스트레스 상태가 되면 DNA, 단백질 또는 지질과 반응하여 생체 내 세포를 손상시키며(3), 이는 노화, 암, 심

혈관 질환, 폐질환(4,5) 등과 같은 다양한 질환을 발생시키는 주요 원인으로 보고되고 있다. 환경오염의 증가와 고령화 등과 같은 여러 원인에 의해서 인체는 산화스트레스에 많이 노출되며 이로부터 세포 손상을 조절하기 위한 기능성 소재 탐색에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(3). 합성 항산화제인 tert-butylhydroquinone(TBHQ), butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA) 등은 높은 항산화 활성을 나타내지만 인체의 지질 변화 및 발암 독성 등과 같은 여러 가지 부작용 때문에 합성 항산화제의 사용은 기피하는 추세가 되어(6), 천연 항산화제 개발을 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 천연 항산화제로 알려진 flavonoid 화합물은 식물이 만들어내는 2차 대사산물로서 복잡한 생합성 경로를 가지며, 식물체에서 이들 flavonoid 함량은 종, 부위에 따라 다르고 계절, 장소, 기후, 재배조건에도 영향을 받는 것으로 알려졌다. 현재까지 발견된 flavonoid 화합물의 종류는 약 5,000여 종 이상 탐색되었고 일반적으로 anthocyanins, flavan-3-ols, flavanones, flavones, flavonols, isoflavones 등으로 구분할 수 있다(7, 8). 생물체에서 flavonoid 화합물의 기능성은 색을 조절하고

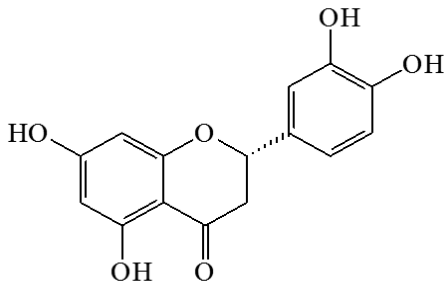


Fig. 1. Chemical structure of eriodictyol.

(9), 자외선을 차단하며(10), 항산화 효과(11)를 나타낸다. Flavonoid 화합물의 한 종류인 eriodictyol 화합물(Fig. 1)은 지질과산화물을 억제하는 효과가 있으며(12), 항염증, 망막 보호, 당뇨병에도 이로운 영향을 미친다고 보고되어 있다(13-15). 따라서 본 연구에서는 싸리나무(*Lespedeza bicolor*) 잎에서 분리한 flavonoid 화합물의 한 종류인 eriodictyol의 HepG2 세포에서 hydrogen peroxide 처리에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 항산화 활성 및 세포 보호 효과를 분석하여 기능성 물질로서 이용 가능성을 평가하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

세포배양에 사용된 HepG2 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)사(Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 및 fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사(Logan, UT, USA)로부터 구입하였으며, hydrogen peroxide(H₂O₂), dimethylsulfoxide(DMSO), 3-(4,5-dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 및 trypsin-EDTA는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Polymerase chain reaction(PCR) 분석에서 이용된 oligo(dT), dNTP, RNase-free water 및 Superscript III First-Strand Synthesis는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. RNeasy Mini Kit, Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit은 Qiagen(Valencia, CA, USA)에서 그리고 oligonucleotide primer는 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Lactate dehydrogenase(LDH), glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), gamma-glutamyl transferase(GGT) 분석시약은 Thermo Scientific(Vantaa, Finland)으로부터 구입하였다. 본 실험에서 사용한 eriodictyol 화합물은 Lee와 Jhoo(16)에 의해 보고된 방법에 따라 싸리나무 잎 추출물에서 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 분리하였으며, 분리된 화합물은 표준품(Sigma-Aldrich Co.)과 ¹H NMR, ¹³C NMR 및 HPLC 분석자료를 비교 분석 후 실험에 사용하였다.

HepG2 세포주 배양

HepG2 세포주는 ATCC사로부터 분양받았으며, DMEM 배지에 10% FBS와 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂를 유지하는 배양기(HERAcCell 150, Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포생존율 분석

Eriodictyol 화합물의 세포생존율을 분석하기 위해 MTT 분석법을 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 DMEM 배지를 이용하여 5×10⁴ cells/well의 HepG2 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 후 상등액 제거하고 PBS로 2회 세척한 다음 DMEM 배지에 시료를 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. DMEM 배양액을 제거한 후 5 mg/mL의 MTT solution 20 µL와 PBS 180 µL를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후 상등액을 모두 제거하여 DMSO 200 µL씩을 첨가하여 생성된 formazan 용해하였으며 이를 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 측정하였다. 세포생존율(%)은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

24-well plate에 DMEM 배지를 이용하여 5×10⁵ cells/well의 HepG2 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 후 각 well에 200 µM hydrogen peroxide와 농도별 eriodictyol 화합물을 24시간 처리하였다. 이후 상등액을 제거하고 수집한 세포로부터 RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 제공된 protocol에 따라 RNA를 추출하였으며, genomic DNA를 제거하기 위해 RNase-free DNase set(Qiagen)를 이용하였다. 생성된 total RNA에 Oligo dT와 dNTP를 첨가하여 65°C에서 5분, 아이스에서 1분 동안 반응 후 Superscript III First-Strand(Invitrogen)를 이용하여 제공된 protocol에 따라 cDNA를 제조하였다. PCR의 반응조건은 25°C에서 10분, 50°C에서 10분, 55°C에서 5분 그리고 4°C에서 유지하는 순으로 수행하였으며, 반응 후 *Escherichia coli* RNase H 1 µL를 첨가하여 37°C에서 20분 동안 반응하였다. 최종적으로 합성된 cDNA는 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 분석

Eriodictyol 화합물이 항산화 효소들의 유전자 발현에 미치는 영향을 검토하기 위하여 superoxide dismutase-1(SOD-1, Cu-Zn SOD), superoxide dismutase-2(SOD-2, Mn SOD), catalase(CAT) 및 glutathione peroxidase(GPx)의 mRNA 발현량을 real-time PCR을 이용하여 분석

Table 1. Sequences of primer used for real-time PCR

Primer	Oligonucleotide sequence
SOD-1	5'-ACGGTGGGCCAAAGGATGAA-3' 5'-TCATGGACCACCAGTGTGCG-3'
SOD-2	5'-AGAAGCACAGCCTCCCCGAC-3' 5'-GGCCAACGCCTCCTGGTACT-3'
GPx	5'-TCGGTGTATGCCTTCTCGGC-3' 5'-CCGCTGCAGCTCGTTCATCT-3'
CAT	5'-CCAACAGCTTTGGTGCTCCG-3' 5'-GGCCGGCAATGTTCTCACAC-3'
β -Actin	5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' 5'-GGAATCCATGCCAGGAAGG-3'

하였다. 항산화 효소의 primer 염기서열은 Table 1에 제시하였다. Real-time PCR 반응액은 Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix(Qiagen), 항산화 유전자의 -F, -R primer(10 pmol/ μ L), H₂O를 혼합한 후 추출한 cDNA에 첨가하여 사용하였다. Real-time PCR은 Qiagen의 Rotor-Gene Q 2 plex를 사용하였으며, 반응조건은 two step cycling protocol을 기준으로 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation을 실시한 후 95°C에서 5초, 60°C에서 10초씩 40 cycles을 반복하고, 60°C에서 95°C까지 3분 동안 증가하는 melting 단계 순으로 수행하였다. Real-time PCR을 통해 증폭된 산물은 Delta delta Ct method를 이용하여 정량하였으며, 각 시료는 β -actin의 발현량으로 보정하였다.

간 기능 지표효소 활성 측정

Eriodictyol 화합물이 간세포 보호에 미치는 영향을 검토하기 위하여 간 기능 지표효소인 LDH, GGT, GOT를 분석하였다. 24-well plate에 DMEM 배지를 이용하여 5×10^5 cells/well의 HepG2 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 HepG2 세포에 200 μ M hydrogen peroxide를 농도별 eriodictyol 화합물과 함께 처리하여 24시간을 배양시켰으며, 이후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 회수한 다음 생화학분석기(Konelab 20B, Thermo Scientific)를 이용하여 LDH, GGT 및 GOT 활성을 측정하였다.

DCFH-DA에 의한 세포 내 ROS 측정

Eriodictyol 화합물 처리에 의한 세포 내 활성산소종 생성 억제 효과를 측정하기 위하여 DCFH-DA assay를 이용하여 측정하였다. 24-well plate에 DMEM 배지를 이용하여 5×10^5 cells/well의 HepG2 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양 후 상등액을 제거하였으며, 이를 PBS로 2회 세척하고 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation 하였다. 각 well에 농도별 시료 및 200 μ M hydrogen peroxide를 처리하여 시간대별로 DCF fluorescence를 excitation 488 nm, emission 530 nm에서 Gemini XPS

microplate spectrofluorometer(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

통계분석

실험 결과는 SPSS 22.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA로 분석하였고, 집단 간 비교를 위한 사후분석은 Tukey로 검증하였으며 $P < 0.05$ 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 모든 분석항목은 3회 이상 반복 시험하여 얻은 결과를 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

세포생존율

Eriodictyol 화합물의 HepG2 세포주 세포생존율에 미치는 영향을 분석하여 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. Eriodictyol 화합물 10~50 μ g/mL 처리 농도에서 HepG2 세포는 약 98% 이상의 생존율을 보였으며, 세포의 산화스트레스 상태를 유도하기 위한 hydrogen peroxide(200 μ M) 및

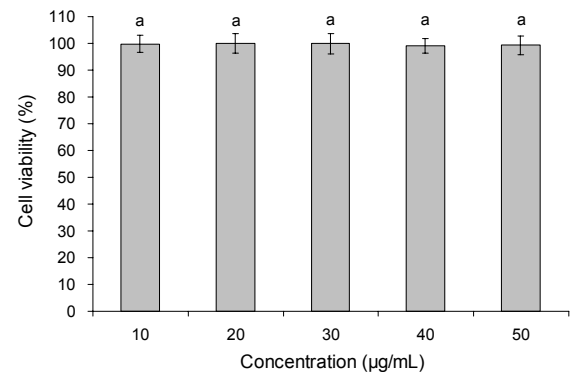


Fig. 2. Effects of eriodictyol on HepG2 cell viability. Values are mean \pm standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

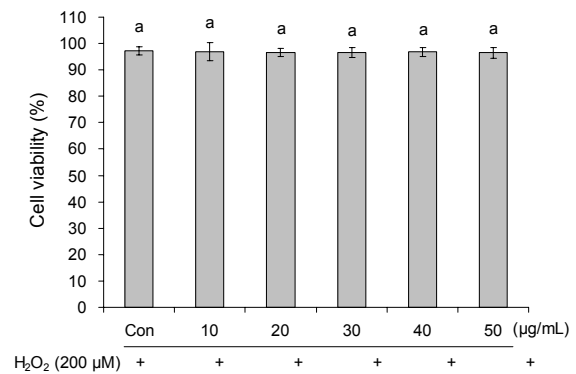


Fig. 3. Effects of eriodictyol and hydrogen peroxide treatment on HepG2 cell viability. Values are mean \pm standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

eriodictyol 화합물을 처리한 실험군의 세포생존율은 약 96% 이상으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 eriodictyol 화합물이 HepG2 세포의 세포 생존율에 영향을 크게 미치지 않는 농도 범위에서 후속 실험을 진행하였다.

항산화 효소 발현 저해 효과

HepG2 세포주에서 hydrogen peroxide에 의해 유발된 산화스트레스 및 간세포 손상으로부터 eriodictyol 화합물 처리에 의한 주요 항산화 효소들의 유전자 발현량을 real-time PCR로 분석하였다(Fig. 4~7). SOD-1의 경우 hydrogen peroxide를 단독 처리한 대조군보다 eriodictyol 화합물 20 µg/mL의 처리 농도에서 약 10% 높은 발현량이 분석

되었으며, 50 µg/mL의 처리 농도에서는 hydrogen peroxide 처리군보다 약 30% 높은 발현량이 분석되었다. 농도가 증가함에 따라 SOD-1의 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4). SOD-2의 경우 30, 40, 50 µg/mL 처리 농도별 발현량이 각각 73.5%, 88.7%, 89.8%로 hydrogen peroxide를 단독 처리한 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5). CAT의 경우 10 µg/mL의 처리 농도에서 hydrogen peroxide 처리군보다 약 27%의 높은 발현량이 분석되었으며, 처리 농도가 증가함에 따라 CAT의 발현량이 유의적으로 증가하였다(Fig. 6). GPx 발현의 경우 10 µg/mL의 처리 농도에서 hydrogen peroxide 처리군보다 약 26.7% 높은 발현량이 분석되었다(Fig. 7).

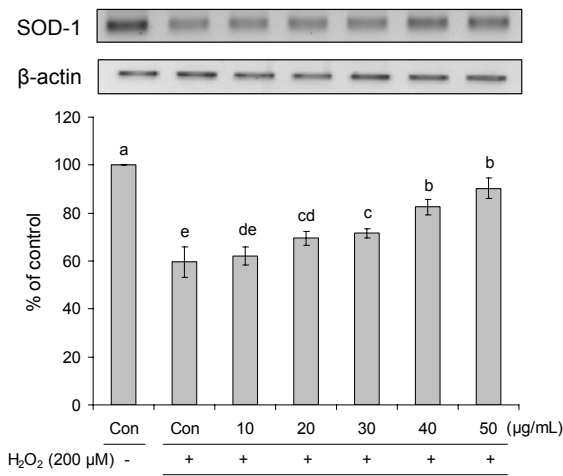


Fig. 4. Effects of eriodictyol on superoxide dismutase-1 (SOD-1) gene expression against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Values are mean±standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

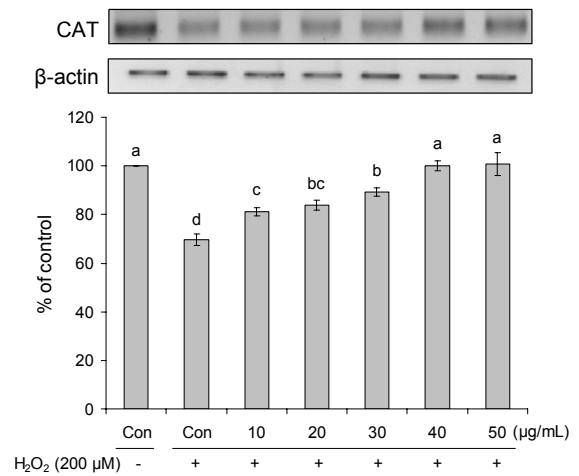


Fig. 6. Effects of eriodictyol on catalase (CAT) gene expression against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Values are mean±standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

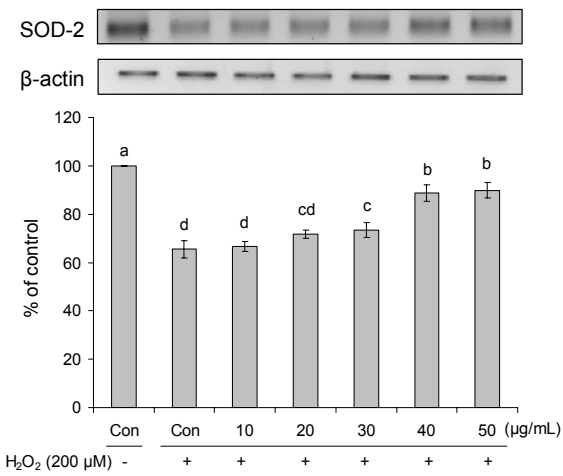


Fig. 5. Effects of eriodictyol on superoxide dismutase-2 (SOD-2) gene expression against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Values are mean±standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

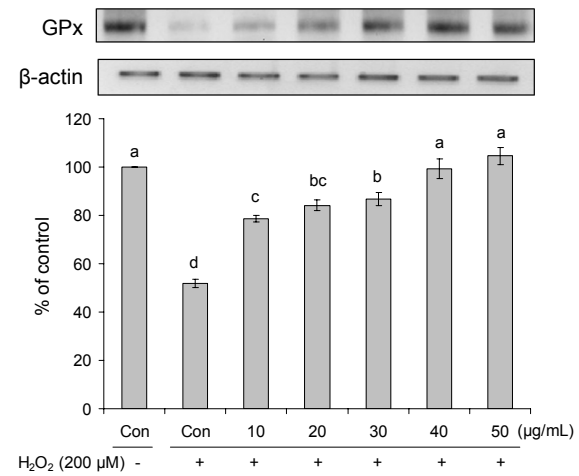


Fig. 7. Effects of eriodictyol on glutathione peroxidase (GPx) gene expression against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Values are mean±standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

Alia 등(17)은 tert-butyl hydroperoxide를 이용하여 산화스트레스가 유발된 HepG2에 quercetin을 처리하여 항산화 효소 활성을 측정하였으며, tert-butyl hydroperoxide만 처리한 처리군과 quercetin을 처리한 군을 비교하였을 때 항산화 효소인 SOD, CAT, GPx의 활성이 유의적으로 증가하는 것을 보고하였다. Morina 등(18)은 ethanol을 투여 후 quercetin 급여가 마우스의 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 보고하였으며, ethanol만 급여한 군과 비교하여 quercetin을 급여한 군에서 SOD, CAT, GPx의 활성이 유의적으로 증가하였고 quercetin을 높은 농도로 급여할수록 SOD, CAT, GPx의 활성이 증가하는 것을 보고하였다. Manju와 Nalini(19)는 쥐에게 1,2-dimethylhydrazine을 피하조직에 투여하여 스트레스 및 발암을 일으키게 한 후 flavonoid 성분인 luteolin을 공급하여 SOD, CAT, GPx, 활성을 측정된 결과 luteolin을 공급하지 않은 control 군보다 항산화 효소 활성이 현저히 증가하는 것을 보고하였다. Wong 등(20)은 쥐에게 D-galactosamine을 투여하여 산화스트레스를 유도한 후 α -tocopherol과 flavonoid의 한 종류인 daidzein을 투여하여 항산화 활성을 평가하기 위하여 total SOD와 SOD-1 활성을 측정하여 보고한 바 있다. 이처럼 flavonoid 화합물은 다양한 기작을 통해 산화스트레스로부터 항산화 효소 활성을 증가시키는 것으로 보고되고 있으며, 본 실험에서 검토한 flavonoid 화합물인 eriodictyol 또한 hydrogen peroxide에 의해 유발된 산화스트레스로부터 SOD-1, SOD-2, CAT, GPx 등과 같은 항산화 유전자 발현을 증가시켜 간세포의 손상을 억제하여 간세포를 보호할 수 있는 것으로 분석되었다.

간 기능 지표효소 분석을 통한 세포 보호 효과

본 실험에서는 hydrogen peroxide를 처리하여 산화적 스트레스가 증가한 HepG2 세포주에 eriodictyol 화합물을 처리하여 상등액 내 GOT, LDH 및 GGT를 분석하였다(Fig. 8~10). GOT는 간과 심장, 횡문근, 혈액 내에 존재하여 아미

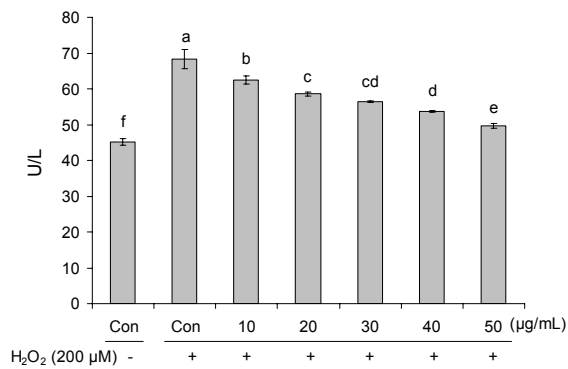


Fig. 8. Effects of eriodictyol on glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) activity against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Values are mean \pm standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

노기 전이반응을 촉매하는 효소로서(21), aspartic acid에서 amino group을 ketoglutaric acid로 치환하여 oxaloacetic acid를 생성한다(22). GOT는 간세포의 손상 정도에 따라 혈액 내로 빠져나와 간염, 간경변 등의 지표로 널리 사용된다(21). HepG2 세포에 hydrogen peroxide로 단독 처리한 대조군의 GOT 활성은 처리하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, eriodictyol 화합물을 처리한 처리군(10~50 μ g/mL)에서 GOT 활성이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). LDH는 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)의 존재하에 혐기적 해당 작용의 최종산물인 L-lactate와 pyruvate 간의 가역적 산화환원반응을 촉매하는 효소로서 간, 심장, 근육 내에 다량 존재한다(23). 심장질환, 간질환, 용혈성 및 악성빈혈 등에서 증가하며, 급성간염에서 GOT와 같이 간세포로부터 유리되어 증가하고 황달을 동반한 독성간염에서 약 10배 정도 증가하는 것으로 알려졌다(24). LDH 활성을 측정된 결과 hydrogen peroxide로 단독 처리한 대조군의 경우 약 965 U/L로 분석되었으며, hydrogen peroxide를 처리하지 않은 대조군의 경우 약 403 U/L의 LDH 활성을 나타내어 hydrogen peroxide 처리에 따른 LDH 활성의 유의적 증가를 확인할 수 있었다. 이때 HepG2 세포에 eriodictyol 화합물 처리(10~50 μ g/mL)에 의해 LDH 활성이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 분석되었다(Fig. 9). GGT는 glutamyl peptide를 가수분해하여 gamma-glutamyl기를 다른 peptide와 amino acid에 전이시키는 효소로서(24) 간, 신장, 비장 췌장 등 체내에 널리 분포되어 있지만 혈청 GGT의 대부분은 간과 담관 상피세포에서 유래한다(25, 26). 혈청 GGT 수치는 알코올 섭취로 인한 간질환의 진단에 이용된다. 알코올 섭취 이외에도 흡연에 의한 폐질환, 활동량에 따른 생활요인, 췌장질환, 신경질환 및 당뇨병 등의 병적 요인에도 관련되어 있으며(25,27), 간세포와 담도 상피세포에 존재하여 간담도 질환 유무의 지표가 되며 알코올성 간질환에 의해 증가하는 것으로 알려졌다(25). HepG2 세포

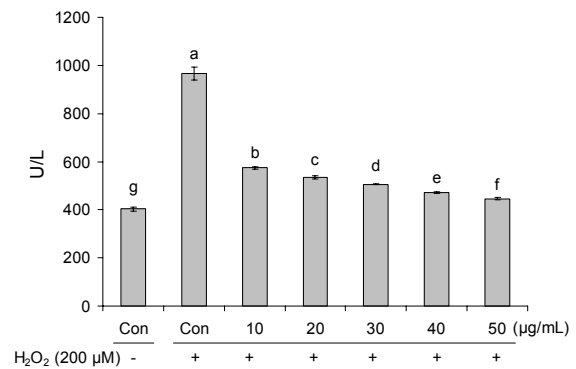


Fig. 9. Effects of eriodictyol on lactate dehydrogenase (LDH) activity against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Values are mean \pm standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

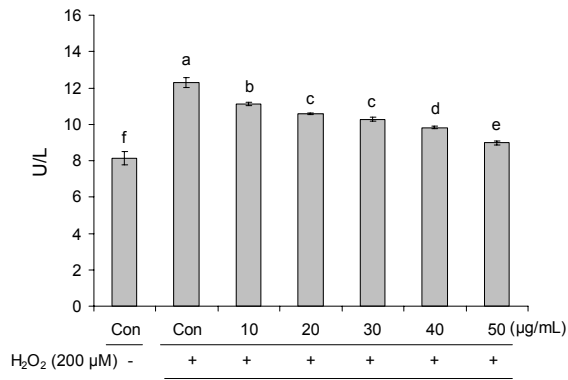


Fig. 10. Effects of eriodictyol on gamma-glutamyl transferase (GGT) activity against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Values are mean±standard deviation of three replicate determinations (n=3). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

주에서 hydrogen peroxide로 단독 처리한 대조군의 경우 이를 처리하지 않은 대조군에 비해 GGT 활성이 유의적으로 증가하였으며, 10~50 µg/mL 농도의 eriodictyol 화합물 처리군은 GGT의 활성이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 10). 이러한 결과 HepG2 세포에서 hydrogen peroxide 처리에 의해 증가한 GOT, LDH 및 GGT의 활성이 eriodictyol 화합물을 처리에 의해 유의적으로 감소하는 것으로 분석되어 eriodictyol 화합물이 간세포 보호 효과에 대한 활성을 가질 수 있을 것으로 기대된다.

세포 내 ROS 생성 저해 효과

HepG2 세포에서 eriodictyol 화합물 처리가 세포 내 활성산소종 생성에 미치는 영향을 DCFH-DA assay로 확인하였다 (Fig. 11). DCFH-DA는 세포 내에서 ROS에 의해 산화되어 형광을 나타내는 DCF로 전환된다. HepG2 세포에 hydrogen peroxide로 단독 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 대조군의 경우 90분간 처리 후 fluorescence의 값은

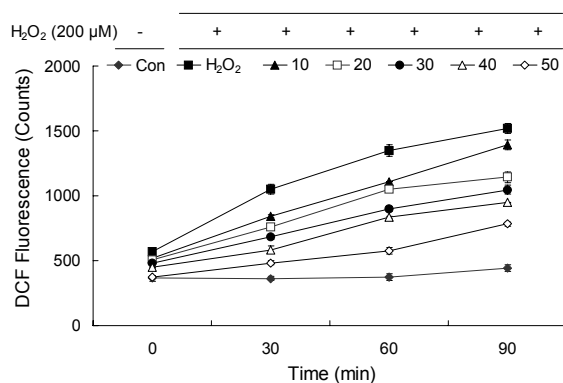


Fig. 11. Inhibitory effect of eriodictyol on ROS production against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Values are mean±standard deviation of three replicate determinations (n=3).

1,519로 나타내는 반면, eriodictyol 화합물 50 µg/mL 농도로 처리한 처리군의 fluorescence의 값은 752로 나타나는 것으로 분석되어 eriodictyol 처리에 의해 증가한 ROS 생성이 감소하는 것으로 나타났다. 특히 eriodictyol 화합물 처리 시 90분 후의 fluorescence 측정 결과, ROS 생성 억제제 hydrogen peroxide로 단독 처리한 대조군에 비해 10 µg/mL의 농도에서 8.3%, 20 µg/mL의 농도에서 24.7%, 30 µg/mL의 농도에서 31.1%, 40 µg/mL의 농도에서 37.7%, 50 µg/mL의 농도에서 48.5% 감소하는 것으로 나타났다. Li 등(28)은 DCFH-DA assay를 이용하여 EA.hy926 세포에서 hydrogen peroxide로 산화스트레스를 유도한 후 eriodictyol 처리에 의한 활성산소종을 측정된 결과 eriodictyol 화합물이 유의적으로 활성산소종 생성을 억제하는 결과를 나타내었다고 보고하였다. Areias 등(29)은 DCFH-DA assay를 이용하여 retinal cell에서 ascorbate/Fe²⁺를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 후 flavonoid 성분인 luteolin, quercetin, eriodictyol, taxifolin 화합물의 활성산소종 억제 효과를 측정된 실험에서 이들 화합물을 처리한 군과 ascorbate/Fe²⁺만 처리한 군을 비교하였을 때 화합물을 처리한 모든 군에서 유의적으로 활성산소종을 감소시켰고, 그중 eriodictyol 화합물을 처리한 군이 다른 처리군보다 더 높은 효과를 나타내는 것으로 보고하였다. Lee 등(30)은 HaCaT cell에 UV 조사를 하여 산화적 스트레스를 발생시켜 활성산소종을 발생시켰다. 이러한 반응 중 eriodictyol 화합물을 처리하여 활성산소종을 유의적으로 억제한 결과를 보여 본 연구 결과와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 본 결과로부터 hydrogen peroxide 처리에 의해 세포 내에 증가한 산화적 스트레스를 eriodictyol 화합물에 처리에 의해 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 싸리나무 잎에서 분리한 flavonoid 화합물인 eriodictyol의 항산화 활성을 평가하기 위해 hydrogen peroxide로 산화적 스트레스를 유도한 HepG2 세포에서 eriodictyol 화합물의 처리가 SOD-1, SOD-2, CAT 및 GPx의 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였으며, 또한 간 기능 지표효소인 GOT, LDH 및 GGT 활성을 분석하였다. 그리고 세포 내 활성산소종 생성 억제 효능을 분석하기 위하여 DCFH-DA assay를 실시하여 eriodictyol 화합물의 기능성 소재로서의 가능성을 알아보고자 본 실험을 하였다. Eriodictyol 화합물의 세포독성을 확인하기 위하여 HepG2 세포주를 이용하여 실시한 결과 eriodictyol 화합물을 10~50 µg/mL의 농도로 처리한 모든 실험군에서 약 98% 이상의 세포생존율을 나타내었다. 항산화 효소 유전자 발현량을 통한 산화스트레스 억제 효과를 분석하기 위하여 HepG2 세포주에 hydrogen peroxide를 처리하여 산화스트레스가 증가시킨 조건에서 eriodictyol 화합물을 처리하여 SOD-1, SOD

-2, CAT 및 GPx 발현량을 분석한 결과 eriodictyol 화합물의 처리 농도가 증가할수록 hydrogen peroxide 처리에 의해 감소한 SOD-1, SOD-2, CAT 및 GPx 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 간 기능 지표효소 활성을 측정하기 위해 GOT, LDH 및 GGT 활성을 분석한 결과 hydrogen peroxide로 단독 처리한 대조군과 eriodictyol 화합물을 처리한 군을 비교하였을 때 eriodictyol 화합물을 처리한 군에서 hydrogen peroxide 처리에 의해 증가한 GOT, LDH 및 GGT 활성이 유의적으로 감소하였다. HepG2 세포주에 eriodictyol 화합물을 처리하여 세포 내 활성산소종 생성에 미치는 영향을 DCFH-DA assay로 확인한 결과 eriodictyol 화합물의 농도가 증가함에 따라 세포 내 활성산소종의 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험을 통하여 eriodictyol 화합물은 산화적 스트레스로부터 항산화 효소 활성을 증가시키며, 활성산소종의 생성을 억제하는 효과를 확인할 수 있었다. 또한 간 기능 지표효소의 활성을 감소시켜 세포 보호 효과를 나타내어 항산화 활성 및 세포 보호 효과를 나타내는 기능성 소재로써 이용 가능성이 높을 것으로 판단되며, 후속연구를 통해 싸리나무 유래 eriodictyol 화합물의 세포 내 항산화 단백질 발현에 미치는 영향 및 동물실험을 통한 항산화 효과를 검증하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 강원대학교 학술연구조성비(과제번호: C1009850-01-01)로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Kwak IS. 2008. Comparison of different assays for evaluating antioxidant activity of polyphenols and tea extracts. *PhD Dissertation*. Chonbuk National University, Jeonju, Korea.
2. Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91: 14S-22S.
3. Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91: 31S-38S.
4. Cienciewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. 2008. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 122: 456-468.
5. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
6. Yang HS, Choi YJ, Oh HH, Moon JS, Jung HK, Kim KJ, Choi BS, Lee JW, Huh CK. 2014. Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 80-85.
7. Yang YY, Kim JY, Kwon O. 2012. Development of flavonoid database for commonly consumed foods by Koreans. *Korean J Nutr* 45: 283-292.
8. Holden JM, Bhagwat SA, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Dwyer JT, Peterson J, Beecher GR, Eldridge AL, Balentine D. 2005. Development of a database of critically evaluated flavonoids data: application of USDA's data quality evaluation system. *J Food Compos Anal* 18: 829-844.
9. Lim SH, Kim JK, Kim DH, Sohn SH, Lee JY, Kim YM, Ha SH. 2011. Flower color modification by manipulating flavonoid biosynthetic pathway. *Kor J Hort Sci Technol* 29: 511-522.
10. Kim MJ, Ryu MJ. 2012. Inhibition of melanogenesis and anti-UV properties *Reynoutria elliptica*. *Kor J Aesthet Cosmetol* 10: 961-968.
11. Garcia-Alonso M, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem* 84: 13-18.
12. Lee SJ, Chung HY, Lee IK, Yoo ID. 1999. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vulgaris* and their antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 31: 815-822.
13. Ismaili H, Sosa S, Brkic D, Fkih-Tetouani S, Ildrissi A, Touati D, Aquino RP, Tubaro A. 2002. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonetii*. *J Pharm Pharmacol* 54: 1137-1140.
14. Zhang WY, Lee JJ, Kim Y, Kim IS, Han JH, Lee SG, Ahn MJ, Jung SH, Myung CS. 2012. Effect of eriodictyol on glucose uptake and insulin resistance in vitro. *J Agric Food Chem* 60: 7652-7658.
15. Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Salomone S. 2012. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol* 84: 88-92.
16. Lee JH, Jhoo JW. 2012. Antioxidant activity of different parts of *Lespedeza bicolor* and isolation of antioxidant compound. *Korean J Food Sci Technol* 44: 763-771.
17. Alia M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. 2006. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 212: 110-118.
18. Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. 2003. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 26: 1398-1402.
19. Manju V, Nalini N. 2005. Chemopreventive potential of luteolin during colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Ital J Biochem* 54: 268-275.
20. Wong MC, Portmann B, Sherwood R, Niemela O, Koivisto H, Parkkila S, Trick K, L'abbe MR, Wilson J, Dash PR, Srirajaskanthan R, Preedy VR, Wiseman H. 2007. The cytoprotective effect of alpha-tocopherol and daidzein against d-galactosamine-induced oxidative damage in the rat liver. *Metabolism* 56: 865-875.
21. Green RM, Flamm S. 2002. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology* 123: 1367-1384.
22. Ahn SY, Park SY. 2012. A diagnostic approach to abnormal liver function tests in asymptomatic patients. *Korean J Med* 82: 134-142.
23. Lim TS, Kim JS, Kim JM. 1984. Electrophoretic patterns of GGT, ALP and LDH isoenzyme in various hepatic diseases. *Kyungpook Univ Med J* 25: 268-285.
24. Yu KH. 2014. Effects of fermented aqueous extracts from *Ligularia fischeri* leaves by using lactic acid bacteria on improving liver function. *PhD Dissertation*. Kangwon National University, Chuncheon, Korea.
25. Kim KS, Jeon DS, Kim JS, Kim JM. 1982. GGT, ALPI and LDH in various liver diseases. *Kyungpook Univ Med J* 23: 325-333.

26. Kim KA. 2009. Understanding and application of liver function tests. *Korean J Med* 76: 163-168.
27. Choi K, Kim BI, Cho YK, Park CY, Sohn JI, Jeon WK, Kim H, Chung ES, Keum DG, Lee HY, Lee SJ. 1999. Diagnostic usefulness of serum γ -glutamyl transferase (GGT) activity in fatty liver and relationship with other factors. *Korean J Med* 57: 1006-1013.
28. Li H, Li C, Shen T, Zhao L, Ren D. 2014. R-eriodictyol and S-eriodictyol exhibited comparable effect against H₂O₂-induced oxidative stress in EA.hy926 cells. *Drug Discov Ther* 8: 214-224.
29. Areias FM, Rego AC, Oliveira CR, Seabra RM. 2001. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe²⁺-induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochem Pharmacol* 62: 111-118.
30. Lee ER, Kim JH, Kang YJ, Cho SG. 2007. The anti-apoptotic and anti-oxidant effect of eriodictyol on UV-induced apoptosis in keratinocytes. *Biol Pharm Bull* 30: 32-37.