광용혈에 대한 플라보노이드의 세포막 보호작용에 관한 연구

박수남 · 부용출 · 이태녕

(태평양기술연구소 · 서울대학교)

Protective Effects of The Flavonoids on Cell Membrane in Photohemolysis

Park Soo-Nam, Boo Yong-Chool, Lee Tae-Young

(Pacific R&D Center)

Ⅰ. 서 론

플라보노이드(flavonoids)는 식물계에 널리 분포되어 있는 천연식물 색소로서 특히 잎, 개화조직, 화분등에 많이 존재하고 흔히 글리코시드(glycosides)로 존재하며, 아글리콘(aglycons) 및 메틸화된 유도체등으로도 널리 분포한다(Jay, 1975; Swain, 1976). 플라보노이드 아글리콘은 벤젠고리(A)와 2-위치에 페닐기를 치환체로 갖고 있는 γ-pyrone(C)으로 구성되어 있는데 벤젠고리에 축합되어 있는 6각형 고리가 γ-pyrone 유도체인 플라보놀(flavanols)과 플라본(flavones), 그리고 이들의 2,3-dihyroderivative인 플라바놀(flavanols)과 플라바논(flavanones)등으로 분류한다.

플라보노이드를 포함하는 생약, 화분등은 고대로 부터 각종 질병을 치료하는데 사용되어 왔으며(Havsteen, 1983), 특히 비타민C와 함께 취약해진 모세혈관을 회복시키는 작용을 갖고 있음이 알려져 있다(Ruszyak et al 1936; Bensath et al, 1936). 플라보노이드의 식물에서의 기능에 대하여 현재 고려되고 있는 것으로는 자외선에 대한 필터작용(Murali et al, 1985)과 활성산소(Takahama, 1983a, 1984b)나 각종 라디칼을 소거(Takahama, 1984b, 1983b)함에 의한 항산화 작용등이 보고되고 있다.

식물을 섭취한 동물에서의 플라보노이드의 작용으로 모세혈관의 저항성 회복, 백혈구의 활성산소 형성 억제(Blackburn et al, 1987), 발암 억제(Nishino et al, 1984; Horiuchi, 1986), 당뇨병성 백내장이나 고혈압 예방, 활성산소 소거(Sorata et al, 1984; Park, 1989a, 1987), 지질과산화 반응의 억제(Younes et al, 1981; Pincemall, 1985; Valenzuela et al, 1987)등이 알려져 있다.

플라보노이드는 $^1O_2$(Sorata et al, 1984; Matuura, 1970, Takahama 1984c,

Park, 1989a), O_2^-(Ueno, 1984; Baumann et al, 1980), ·OH(Nasr et al, 1987; Husain, 1987), H_2O_2(Barz et al, 1981; 1985, Miller et al, 1985) 등의 활성산소종(active oxygen species)과 반응한다고 최근에 보고되고 있다.

한편 생체내에서 생성되는 활성산소종 및 유기 자유 라디칼(organic free radical)은 세포막의 손상, 막지질의 과산화(peroxidation)를 비롯하여 단백질, 핵산, 탄화수소등 생체 고분자 물질의 파괴에 관여하여 세포의 손상, 돌연변이 유발, 발암, 조직의 노화등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Leibovitz and Siegel, 1980; Foote, 1982; Krinsky, 1979; Straight and Spikes, 1985).

이들 활성산소종은 광합성이나 high energy조사라는 특수 환경 아래서 뿐만 아니라 생체내에서 O_2^-을 거쳐 효소반응으로 생성될 수 있음은 물론 백혈구의 식균작용(Krinsky, 1982)이나 면역학적인 자극(Klebanoff, 1980) 및 광증감 작용등에 의해서도 생성되어 조직의 염증, 세포막의 산화적 변질등에 관여함이 최근에 밝혀지고 있다(Park, 1987, 1989a, 1989b).

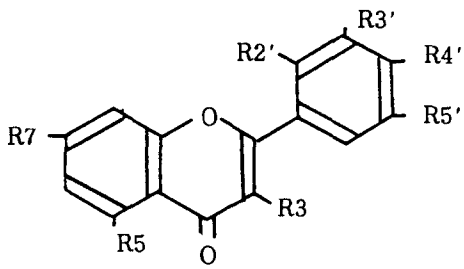
활성산소종은 반응성이 특히 큰 $^1O_2$이 β-carotene에 의해 효과적으로 소광된다는 사실이 알려지자(Foote & Denny, 1968), $^1O_2$에 대한 생체 보호작용에 관한 관심이 높아왔으며 Park(1984a, 1984b, 1987)등은 capsanthin, fucoxanthin, astaxanthin등의 소광 속도 상수를 측정하여 $^1O_2$ 소광 활성과 카로티노이드의 구조와의 관계를 밝힌 바도 있다(Lee et al, 1987b, 1987c). 또한 in vitro에서 광증감 작용에 의한 적혈구 광용혈 실험을 통하여 이들 카로티노이드들의 광용혈 억제효과를 측정, $^1O_2$소거 활성과 비교한 바 capsorubin, fucoxanthin은 β-carotene보다도 $^1O_2$ 소거 활성은 낮음에도 불구하고 현저한 세포막 보호 효과가 있음을 확인한 바 있다. 이외에도 ·OH 스캔빈져인 mannitol을 비롯하여 각종 항산화제의 광용혈에 미치는 영향, 인삼성분 및 비타민C를 투여한 guinia pig의 적혈구용혈, 그리고 아스피린이 용혈에 미치는 영향에 관한 연구등으로 $^1O_2$에 의한 적혈구 광용혈 메카니즘에는 $^1O_2$ 이외에도 반응성이 큰 활성산소종이 관여하고, 아라키돈산 cascade에 관련된 효소들이 수반되고 있음을 제안한 바 있다(Lee et al, 1987a, 1987c; Park 1987, 1989a, 1989b).

플라보노이드는 카로티노이드 못지않게 식물체에 널리 존재하고 항산화 작용 및 각종 효소에 대한 저해활성은 보고되고 있으나 세포막의 손상을 통해 세포의 파괴, 조직의 노화 등의 원인이 되고 있는 활성산소에 의한 세포막 손상에 미치는 플라보노이드의 영향

에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

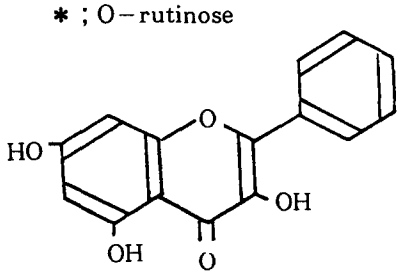
본 연구에서는 각종 플라보노이드의 광용혈에 미치는 영향 및 라디칼 소거 활성등을 조사하여 활성산소가 세포막에 미치는 메카니즘과 아울러 플라보노이드의 세포막 보호 작용 메카니즘을 밝히고자 시도한 것의 일부이다. 실험재료로 사용된 일부 플라보노이드는 실험실에서 직접 분리하였으며 본 연구에 사용된 플라보노이드는 모두 24 종으로 그들의 구조는 Fig.1-5와 같다.

Fig. 1 Structures of flavonols.

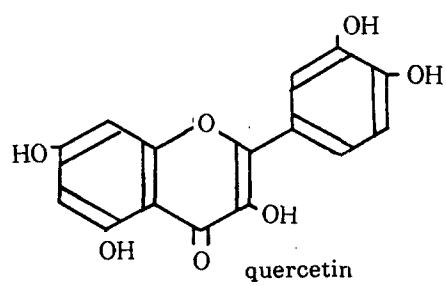


compound	R3	R5	R7	R2'	R3'	R4'	R5'
galangin(1)	OH	OH	OH	H	H	H	H
quercetin(2)	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
kaempfefol(3)	OH	OH	OH	H	H	OH	H
myricetin(4)	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
fisetin(5)	OH	H	OH	H	OH	OH	H
morin(6)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
3-hydroxy-flavone(7)	OH	H	H	H	H	H	H
rutin(8)	*	OH	OH	H	OH	OH	H

* ; O-rutinose

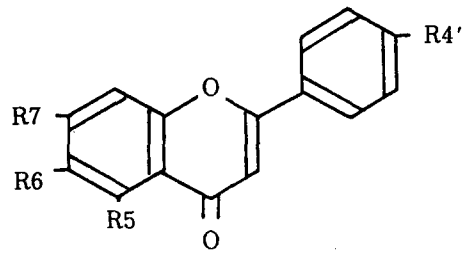


galangin



quercetin

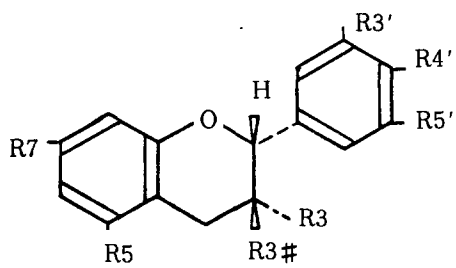
Fig. 2 Structures of flavones.



compound	R5	R6	R7	R4'
baicalein(9)	OH	OH	OH	H
apigenin(10)	OH	H	OH	OH
chrysin(11)	OH	H	OH	H
acacetin(12)	OH	H	OH	OMe
baicalin(13)	OH	OH	*	H
flavone(14)	H	H	H	H

* ; O-glucuronic acid

Fig 3. Structures of flavanols.

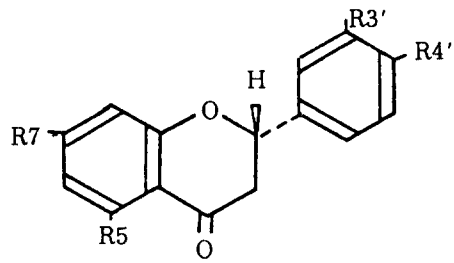


compound	R3	R3#	R5	R7	R3'	R4'	R5'
(-)-EGCG(15)	*	H	OH	OH	OH	OH	OH
(-)-epicat-echin(16)	OH	H	OH	OH	OH	OH	H
(+)-catechin(17)	H	OH	OH	OH	OH	OH	H

(-)-EGCG ; (-)-epigallocatechin gallate

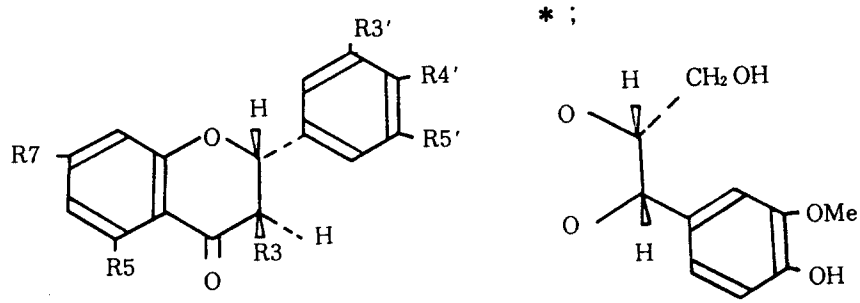
* ; O-galloyl

Fig. 4 Structures of flavanones.



compound	R5	R7	R3'	R4'
naringenin(18)	OH	OH	H	OH
hesperetin(19)	OH	OH	OH	OMe

Fig. 5 Structures of flavanonols.



compound	R3	R5	R7	R3'	R4'	R5'
silybin(20)	OH	OH	OH	H	*	
dihydrorobinetin(21)	OH	H	OH	OH	OH	OH
taxifolin(22)	OH	OH	OH	OH	OH	H
aromadendrin(23)	OH	OH	OH	H	OH	H

Ⅱ. 실 험

1. 사용기기, 시약 및 재료

1) 사용기기

전자 흡수 스펙트럼은 Cecil사의 spectrophotometer(CE-5500)을, 적외부 스펙트럼은 Nicolet사의 Fourier Transform Infrared Spectometer(20-SXC/GC), 핵자기 공명 스펙트럼은 Varian사의 NMR spectrometer(EM 360L)을 사용하여 측정하였고, 분리된 시료의 분자량 측정에는 Hewlett Packard 5985B GC/MS로 source temp. 200℃, electron energy 70eV, electron multiplier 2000V을 이용하였다.

적혈구 현탄액의 투광도는 적색광에 민감한 CETRON CEA 30 phototube를 장비한 Bausch & Lomb사의 Spectronic 20D로 측정하였다.

2) 시 약

광증감제인 rose-bengal(RB), 유기 자유 라디칼인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), DL-α-tocopherol, 등은 모두 Sigma제를 그대로 사용하였다. 채혈시에 혈액의 항 응고제로 사용한 sodium citrate는 Kanto Chemical Co. 제품이었으며 완충용액 제조에 사용된 $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4\ 2H_2O$, NaCl등은 모두 시판 일급 시약이었다. 시료의 추출, 분리, 정제 및 자유 라디칼 실험의 용제로 사용된 헥산, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 에탄올, 메탄올 등은 모두 실험실에서 분별증류를 통해 재정제하여 사용하였다. 플라보노이드의 분리에 사용된 TLC판은 Merk제 silicagel G 60이 0.2mm두께로 precoat된 알루미늄 판이었다.

3) 재 료

실험에 사용한 플라보노이드중 kaempferol, quercetin, myricetin, morin, rutin, chrysin, apigenin, flavone, hesperetin, naringenin, (+)-catechin은 Sigma제, silybin(silymarin group), 3-hydroxy flavone, fisetin, 7,8-benzoflavone은 Aldrich 제품을 그대로 사용하였고 acacetin, aromadendrin, taxifolin, dihydrorobinetin등은 일본 Toyama 대학 Hayashi박사로 부터 고맙게 제공받아 사용하였다. 그외에 시료로 사용된 baicalein,

baicalin은 약재용 황금(Scutellaria baicalensis Georgi)에서, galangin은 약재용 고량강(Alpinia officinarum Hance)로 부터. (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate는 태평양화학의 녹차원료인 녹차엽으로 부터 각각 분리하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 플라보노이드의 분리

1) - 1. (-)-Epigallocatechin gallate의 분리

녹차(Camellia sinensis L.)엽(100g)을 에탄올로 실온에서 침적하여 얻은 총 추출물(14g)을 60% 에탄올 300ml에 재 용해하고 클로로포름 100ml로 지질, 엽록소, 카페인 등을 제거한 다음 아세테이트 200ml로 추출하여 플라노이드 분획 4g을 얻었다.

플라보노이드 분획 3g을 클로로포름/메탄올/물의 혼액(50:10:1)을 용출 용매로하는 실리카겔 칼럼(100g) 크로마토그래피하여 (-)-epicatechin, 0.2g; (-)-epigallocatechin, 0.4g; (-)-epigallocatechin gallate(EGCG) 0.6g을 얻었다. 위의 용출 용매를 전개용매로 한 박층 크로마토그래피에서 이들의 Rf치는 각각 0.25 0.17, 0.12이었으며 에탄올 용액중 극대 흡수파장은 각각 281, 277, 275nm이었다.

(-)-Epicatechin은 사용직전 함수 아세톤에서 재결정한 후 사용하였으며 (-)-epicatechin 및 (-)-epigallocatechin gallate는 박층 크로마토그래피로 재 정제하여 사용하였다. 이들의 자외부 흡수 스펙트럼, NMR 스펙트럼 및 분자량 측정으로 얻은 데이타 등은 authentic 시료와 일치하였다(Park, 1989a).

1) - 2. Baicalein 및 baicain의 분리

약재용 황금(Scutellaria baicalensis Georgi) 250g을 에탄올로 침적 추출하여 총 추출물 20g을 얻었고 이를 60% 에탄올 300ml에 재 용해하고 클로로포름 100ml로 추출하여 플라보노이드 분획 6g을 얻었다. 플라보노이드 분획 3g을 클로로포름/메탄올의 혼액(10:1)을 용출 용매로 하는 실리카겔 칼럼(70g) 크로마토그래피하여 baicalein, 0.4g을 얻었다. 위의 용출 용매를 전개용매로한 박층 크로마토그래피에서 baicalein의 Rf치는 0.31이었으며, 에탄올 용액중의 극대 흡수파장은 275nm이었다. Baicalein은 사용 직전 무수에탄올에서 재결정하여 사용하였다.

에탄올 추출물 중 에테르 불용분을 n-BuOH : HOAc : H O=4:1:5의 혼합용매의 상층을 전개용매로 한 박층 크로마토그래피에서 Rf치 0.21되는 부분을 에탄올로 용출하여 baicalin을 얻었다. 에탄올 용액중의 극대 흡수파장은 280nm이었으며 자외부 흡수 스펙트럼, 분자량 측정 등에서 기 보고된 데이타와 일치하였다(Tomimori et al,1982., Park, 1989a).

실험에 사용된 각종 플라보노이드의 몰 흡광 계수 (molar extinction coefficient)중 일부는 문헌에 의존하였으며, 일부는 본 실험에서 결정하였다(Park, 1989a).

1) -3. Galangin의 분리

약재용 고량강(Alpinia officinarum Hance) 200g을 아세톤으로 가열 추출하여 여과하고, 이 여액을 감압 농축하여 11g의 건고물을 얻었고, 이를 에틸아세테이트 100ml에 현탁시킨 후 여과하여 여액만을 재차 농축하여 5g을 얻었다. 이를 컬럼크로마토그래피용 용출 용매 (헥산 : 에틸아세테이트= 3:2) 30ml에 현탁시킨 후 여액중 10ml를 실리카겔 컬럼(80g) 크로마토그래피하였다. Galangin이 포함된 분획을 위의 용출 용매로 재결정하여 미황색의 침상 결정을 얻었으며, galangin은 위의 용출 용매를 전개용매로 한 박층 크로마토그래피에서 Rf치는 0.4이었고 에탄올 용액중 극대 흡수 파장은 268nm, 361nm이었다(Park, 1989a).

2) 라디칼 소거활성의 측정

각종 플라보노이드의 프리 라디칼 소거활성의 측정에는 유기 자유 라디칼인 1,1-diphenyl-2-picryhyrazyl(DPPH)을 이용하였다(Poirier et al, 1952;Braude et al, 1954; Lyons & Waston, 1955; Fujita et al, 1988). 그 활성의 크기는 DPPH (66.7 μM)의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도 (SC_{50}, μM)로서 표기하였다.

실험방법은 0.2mM DPPH메탄올 용액 0.5ml에 여러 농도의 플라보노이드 에탄올 용액 1ml를 첨가하고 섞은 다음 실온에서 10분간 방치한 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 광용혈 실험

실험에서 사용된 적혈구는 삼육축산농원(경기도 화성군)에서 구입한 생후 6개월 된 건강한 토끼로 부터 얻었으며, 토끼의 표준 식이로는 미원 사료회사의 방부제와 항생제가 첨가되지 않은 송아지 이유식 배합사료를 냉장 보관하면서 사용하였다.

채혈 즉시 sodium citrate를 첨가한 시험관에 넣은 후, 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate 완충용액(pH7.4 , $Na_2HPO_4 12H_2O$ 1.6mM)으로 세척하여 원심분리하였다. 원심분리한 후 침전된 적혈구의 바로 위면에 있는 흰색의 백혈구층을 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였으며(Lee et al., 1987b) 모든 실험은 채혈 후 12시간 이내에 행하였다.

광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다(Lee, 1988). 실험에 사용된 적혈구 현탄액은 700nm에서 O.D.가 0.6이었으며 hemocytometer를 사용하여 현미경하에서 직접 적혈구의 수를 측정한 결과 1.5×10^7 RBC/ml이었다.

3) - 1. 플라보노이드의 광용혈 억제 효과

1.5×10^7 RBC/ml 현탄액 3.5ml를 파이렉스 시험관(No.9820)에 넣은 후, 플라보노이드 혹은 각종 첨가물을 첨가하였다. 플라보노이드는 에탄올에 녹인 0.4mM, 0.8mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 40 mM, 80 mM 용액을 각각 50 μl씩 첨가하였다.

암소에서 30분간 pre-incubation시킨 후, 광증감제로 rose-bengal(12 μM)의 0.5ml를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film)으로 입구를 봉한 후 15분간 광조사하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50cm × 20cm × 25cm크기의 상자안에 20 W 형광등(FL-20D금호전기)을 장치하고, 형광등에서 5cm 거리에 적혈구 현탄액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 광을 조사하였다(Fig.6).

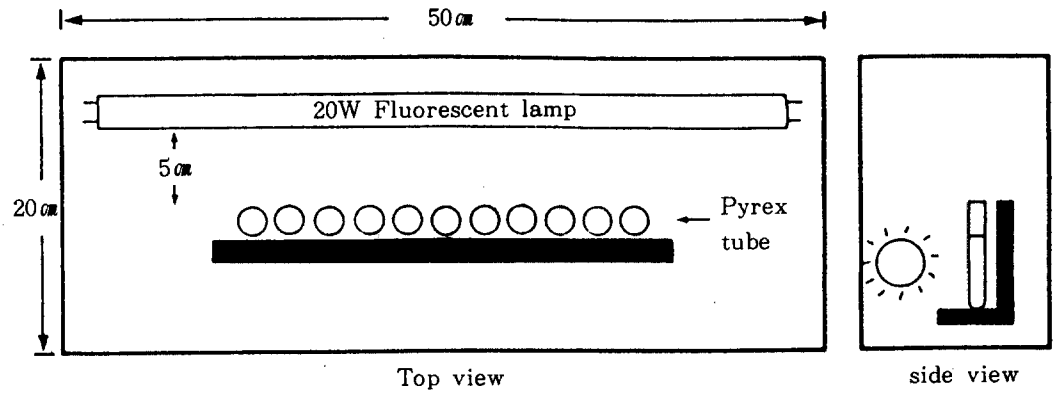


Fig. 6 Irradiation equipment

광조사가 끝난 후 post-incubation에 의한 적혈구의 파괴속도를 15분 간격으로 700nm에서 산란에 의한 투광도의 감소로 부터 구하였다. 이 파장에서 적혈구 현탄액의 산란에 의한 투광도의 감소는 적혈구의 농도에 비례한다(Lee, 1988). 모든 실험은 27 ℃항온실에서 행하였다.

각 시료는 1회당 4개씩하여 평균하였으며 모두 3회씩 반복하고 용혈정도(%hemolysis)는 광조사 전의 적혈구 현탄액이 나타내는 O.D.에 대한 용혈이 진행된 적혈구 현탄액의 O.D.의 비로 부터 결정하였다.

플라보노이드 및 각종 첨가물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로 부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50}을 구하여 비교하였다.

Fig.7는 1.5 μM의 rose-bengal에 의한 광용혈을 그림으로 나타낸 것이며 대조군(control) 32분으로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사를 했을 경우 post-incubation time 120분까지는 용혈에 거의 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 특별한 경우을 제외하고는 대부분 실험에 있어서 post-incubation시간으로 120분 까지만 용혈정도를 측정하였다.

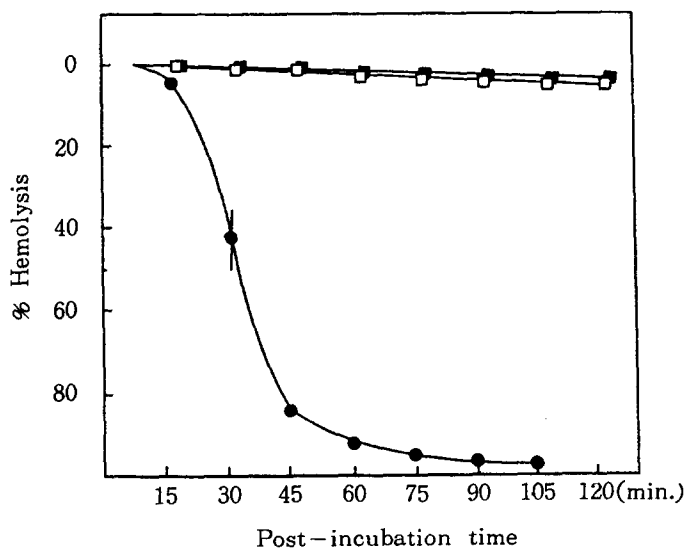


Fig. 7. Rose-bengal sensitized photohemolysis of rabbit erythrocyte in 0.9% saline phosphate buffer(pH, 7.4). * Irradiation time ; 15min. [rose-bengal]=1.5μM

●● ; with rose-bengal, irradiation, control
□□ ; without rose-bengal, irradiation.
■■ ; with rose-bengal, no irradiation.

Ⅲ. 결　　과

1. 플라보노이드의 라디칼 소거 활성

각종 플라보노이드의 라디칼 소거 활성을 table 1에 정리하였다(부록참조).

Table1. Free radical-scavenging activities of flavonoids.

compound	position of OH	activity (SC_{50}, μM)
FLAVONOL		
galangin(1)	3, 5, 7	121.
quercetin(2)	3, 5, 7, 3′, 4′	6.8
kaempferol(3)	3, 5, 7, 4′	15.9
myricetin(4)	3, 5, 7, 3′, 4′, 5′	6.2
fisetin(5)	3, 7, 3′, 4′	8.3
morin(6)	3, 5, 7, 2′, 4′	19.3
3-hydroxy flavone(7)	3	1840.
rutin(8)	3-rutinose, 5, 7, 3′, 4′	7.5
FLAVONE		
baicalein(9)	5, 6, 7	15.8
apigenin(10)	5, 7, 4′	1380.
chrysin(11)	5, 7	>5000.
acacetin(12)	5, 7, 4′-OMe	>1000.
baicalin(13)	5, 6, 7-glucuronic acid	17.5
flavone(14)		>50000.
FLAVANOL		
EGCG(15)	(2S,3S) 3-galloyl1,5,7, 3′, 4′, 5′	2.5
(−)-epicatechin(16)	(2S,3S) 3, 5, 7, 3′, 4′	9.8
(+)-catechin(17)	(2R,3S) 3,5,7,3′,4′	9.9
FLAVANONE		
naringenin(18)	5, 7, 4′	51200.
hesperetin(19)	5, 7, 3′, 4′-OMe	645.

FLAVANONOL		
silybin(20)	3, 5, 7, (3′,4′)*	85.4
dihydrorobinetin(21)	3, 7, 3′, 4′, 5′	10.4
taxifloin(22)	3, 5, 7, 3′, 4′	21.6
aromadendrin(23)	3, 5, 7, 4′	519.

EGCG ; (−)−epigallocatechin gallate

자유 라디칼(66.7 μM)의 50 %를 소거하는데 요구되는 플라보노이드의 농도(μM) 로써 소거 활성을 표기하였다.

1) 플라보노이드의 평면 혹은 비평면 구조에 따른 활성

플라보노이드는 2위치의 이중결합 유무에 따라 A 환과 C 환이 서로 평면 혹은 비평면인 구조를 갖는다. 즉 플라본과 플라보놀은 평면구조를, 플라바논, 플라바놀과 플라바노놀은 비평면 구조를 갖는다(Mori, 1988).

평면 또는 비평면 구조의 플라보노이드의 활성을 비교하기 위해 동일 위치에 동수의 히드록시기를 갖는 플라본과 플라바논 및 플라보놀과 플라바놀을 각각 비교한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같으며, 평면 구조의 플라보노이드가 보다 강한 활성을 보였다.

Table 2. Free radical−scavenging activities of planar and non−planar flavonoids.

compound	A/C ring relationship	activity (SC_{50}, μ M)
FLAVONE		
apigenin(10)	planar	1380.
FLAVANONE		
naringenin(18)	non−planar	51200.
FLAVONOL		
quercetin(2)	planar	6.8
FLAVANOL		
(+)−catechin(17)	non−planar	9.9
(−)−epicatechin(16)	non−planar	9.8

2) 히드록시기가 활성에 미치는 영향

3위치의 히드록시기 유무에 따른 활성을 비교한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같으며 3위치의 히드록시기가 활성에 중요한 기여를 하였다.

Table 3. Effect of hydroxy group on activity.

compound	position of OH	activity (SC_{50}, μM)
FLAVONE		
apigenin(10)	5, 7, 4′	1380.
FLAVONOL		
kaempferol(3)	3, 5, 7, 4′	15.9
FLAVANONE		
naringenin(18)	5, 7, 4′	51200.
FLAVANONOL		
aromadendrin(23)	3, 5, 7, 4′	519.

히드록시기의 갯수에 따른 활성을 비교한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같으며, 히드록시기가 많을 수록 활성이 증가하는 경향이 있었다.

Table 4. Effect of hydroxyl group on activity.

compound	position of OH	activity (SC_{50}, μM)
FLAVONE		
chrysin(11)	5, 7	>5000.
apigenin(10)	5, 7, 4′	1380.
FLAVONOl		
galangin(1)	3, 5, 7	121.
kaempferol(3)	3, 5, 7, 4′	15.9
quercetin(2)	3, 5, 7, 3′, 4′	6.8
myricetin(4)	3, 5, 7, 3′,4′,5′	6.2
FLAVANONOL		
aromadendrin(23)	3, 5, 7, 4′	519.
traxifolin(22)	3, 5, 7, 3′4′	21.6
dihydrorobinetin(21)	3, 7, 3′,4′,5′	10.4

히드록시기의 위치에 따른 활성을 비교한 결과는 Table 5 에서 보는 바와 같으며 히드록시기가 서로 인접하고 있는 경우가 활성이 높았다.

Table 5. Effect of hydroxyl group on activity.

compound	position of OH	activity (SC_{50}, μM)
FLAVONE		
apigenin(10)	5. 7. 4′	1380.
baicalein(9)	5, 6, 7	15.8
FLAVONOL		
morin(6)	3, 5, 7, 2′,4′	19.6
quercetin(2)	3, 5, 7, 3′,4′	6.8

2. 플라보노이드의 광용혈 억제 효과

1) 플라보놀의 영향

플라보놀의 광용혈 억제효과는 Fig.9 및 Table 6 에서 보는 바와 같다.

Galangin, quercetin, kaemferol, myricetin, fisetin 은 모두가 5 μM의 저농도에서도 뚜렷한 용혈억제 효과를 보였으며 농도 의존적으로 효과가 증가하였다 (Table 6, Fig. 8).

특히 galangin은 극히 낮은 농도인 0.5μM에서도 다른 플라보노이드에서는 찾아볼 수 없는 뚜렷한 용혈억제 효과(τ_{50} = 37분)를 보였으며, 농도 의존적으로 그 효과가 급격하게 증가하였다. 즉 광조사 후 계속 해서 post-incubation 시간에 따른 용혈정도를 측정한 결과 10 μM에서는 τ_{50}이 180분, 25 μM에서는 17시간 이었으며, 50 μM의 농도에서는 30 시간으로 증가하였다.

Fig.9의 흑색으로 표시된 막대 그래프는, 광용혈 실험에 있어서 플라보노이드의 농도가 50 μM일 경우의 τ_{50}을 컨트롤의 τ_{50} (32분)으로 나눈 수치를 나타내는 것이며, 사선으로 표시된 막대 그래프는 이미 앞에서 측정된 자유 라디칼 소거활성을 나타내는 농도(M)에 -log를 취해준 값을 나타낸다.

Galangin의 용혈 억제 효과는 56으로 표시되어야 하는데 다른 플라보노이드들의 상호비교를 위해 10까지만 표시를 하였다(park, 1989a).

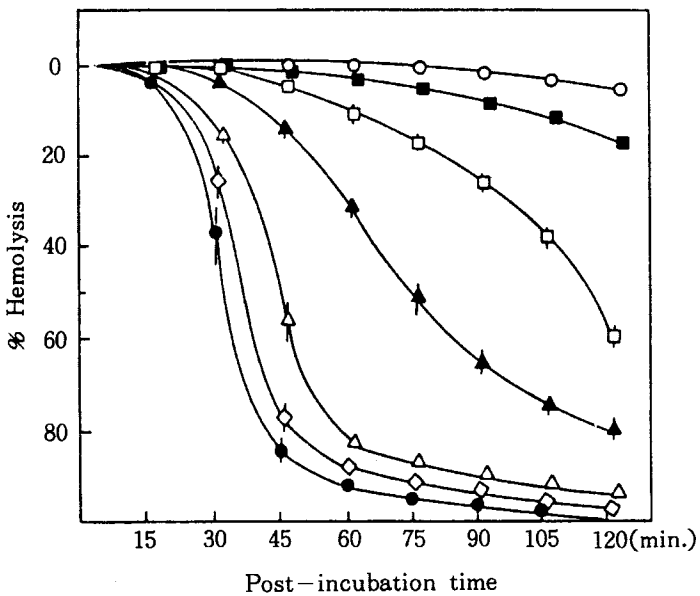


Fig. 8 Dose effect of galangin on the rose-bengal sensitized photohemolysis of rabbit erythrocyte.
*Irradiation time ; 15min.
*Pre-incubation time ; 30min.
*Conc. of rose-bengal ; 1.5μM
Conc. of galangin ;
●-● ; control ◇-◇ ; 0.5μM △-△ ; 1μM
▲-▲ ; 2.5μM □-□ ; 5μM ■-■ ; 10μM
○-○ ; 25μM

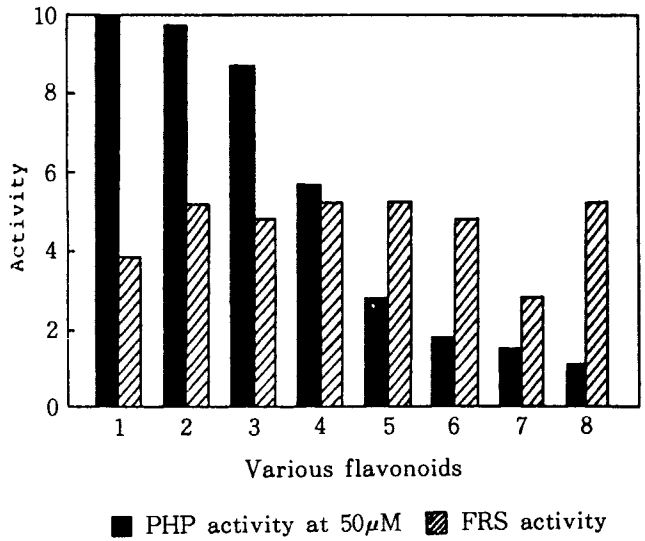


Fig. 9. The photohemolysis-protecting(PHP) activities and the free radical-scavenging (FRS) activities of flavonoids and their aglycons. The activities were defined in the text.

1 ; galangin 2 ; quercetin
3 ; kaempferol 4 ; myricetin
5 ; fisetin 6 ; morin
7 ; 3-hydroxy flavone 8 ; rutin

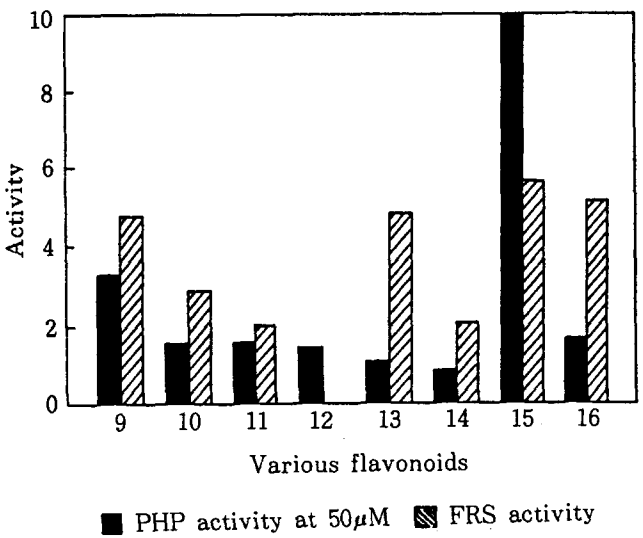


Fig. 9 (Cont.)

9 ; baicalein　　10 ; apigenin
11 ; chrysin　　12 ; acacetin
13 ; baicalin　　14 ; flavone
15 ; (−)−epigallocatechin gallate
16 ; (−)−epicatechin

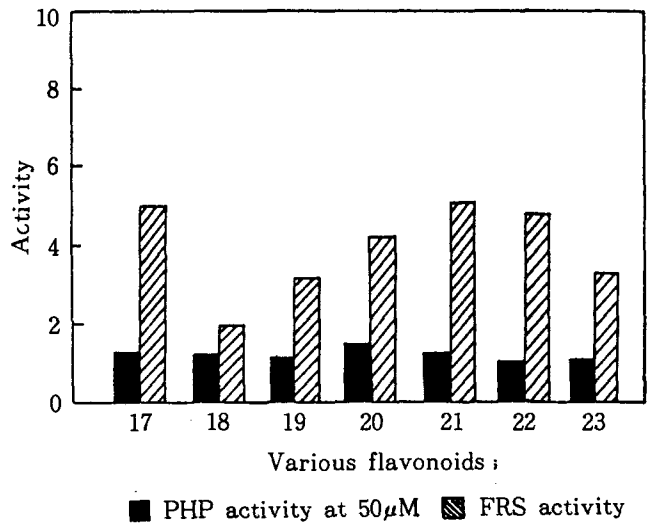


Fig. 9. (Cont.)

17 ; (+)−catechin　　18 ; naringenin
19 ; hesperetin　　20 ; silybin
21 ; dihydrorobinetin　　22 ; taxifolin
23 ; aromadendrin

Galangin은 다른 플라보노이드와는 달리 B환에 치환된 OH가 없음에도 불구하고 용혈억제 효과가 가장 큰 것은 주목할 만하다.

Quercetin 및 kaempferol은 50μM에서 post-incubation시간이 120분경과했을 경우에도 90% 이상의 용혈억제 효과를 보였다. Myricetin은 kaempferol

Table 6. Effects of various flavonoids on the rose bengal sensitized photohemolysis on rabbit erythrocyte.

compounds	τ_{50}(half-time hemolysis ; min.)				
	5	10	25	50	100(μM)
FLAVONOL					
galangin(1)	115	180	1020	1800	
quercetin(2)	40	57	123	315	
kaempferol(3)	40	54	102	280	
myricetin(4)	38	48	85	160	
fisetin(5)	35	40	46	87	
morin(6)			43	55	125
3-hydroxy flavone(7)			40	46	76
rutin(8)			32	32	30
Flavone					
baicalein(9)		38	45	106	
apigenin(10)			45	51	80
chrysin(11)			41	50	
acacetin(12)			37	45	
baicalin(13)				32	26
flavone(14)			28	25	22(15)[a]
7,8-benzo-flavone	25	22	20	16	
FLAVANOL					
EGCG(15)	60	95	260	400	
(-)-epicatechin(16)			43	50	72(168)[b]
(+)-catechin(17)			37	42	52(97)[b]

FLAVANONE			
naringenin(18)		41	50
hesperetin(19)		37	47
FLAVANONOL			
silybin(20)	41	49	60
dihydroro－binetin(21)		41	47
taxifolin(22)		33	36
aromaden－drin(23)		33	36
α－tocopherol		45	

* Irradiation time ; 15min, *Pre－incubation time ; 30min.
〔rose－bengal〕=1.5μM, *Half－time hemolysis(control)=32min.
EGCG ; (－)－epigallocatechin gallate
a ; 1000μM, b ; 500μM

및 quercetin보다는 그 효과가 약간 떨어졌으며 fisetin과 morin은 myricetin 다음으로 효과를 보였다.

한편 3위치에 히드록시기 하나만 있고 A환 및 B환에는 히드록시기가 없는 3-hydroxy flavone은 상기 플라보노이드들 중에서 가장 낮은 용혈억제 효과(50μM에서τ_{50}=46분)를 보였다. 히드록시기가 전혀 없는 flavone이 용혈억제 효과를 보이지 못한 것과는 대조적으로 3위치의 히드록시기가 용혈억제에 크게 기여하는 것으로 보였다. 적혈구의 용혈억제 효과는 3-hydroxy flavone < morin < fisetin < myricetin < kaempferol < quercetin < galangin 순으로 증가 하였다.

이상의 결과들에 비추어 볼 때 용혈억제 경향은 2위치에 이중결합, 3위치 -OH 및 5,7위치의 -OH기의 존재가 기여를 한 것 같으며, 또한 3',4'위치의 OH기가 영향을 미치고 있는 것으로 생각 되었다.

실험한 플라보놀 중 글리코시드인 rutin은 50μM이하에서는 적혈구 용혈에 영향이 없으나 100μM에서는 용혈을 오히려 약간 촉진하는 경향이 있었다(Fig.9, Table 6). Rutin의 라디칼 소거활성은 그 아글리콘인 quercetin과 비슷하였으나, 앞서 언급한 바와 같이 광용혈 억제효과는 보이지 않았다.

한편 galangin은 quercetin, kaempferol, myricetin, morin, fisetin

등 보다도 라디칼 소거활성이 작음에도 불구하고($SC_{50}=121\,\mu M$), 이들 플라보놀보다 월등히 큰 용혈억제 효과를 나타내었다. 이는 플라보노이드에 의한 광용혈 억제가 라디칼 소거활성에 전적으로 의존하는 것은 아님을 보여주는 결과라고 사료된다.

부록에서 볼 수 있듯이, 모든 플라보노이드의 광용혈 억제 효과 측정에서 컨트롤의 적혈구 용혈이 일정한 sigmoidal time curve로 나타나고 이때의 τ_{50}은 모두 32분이 되도록 모든 조건을 통제하여 실시하였기 때문에 각종 플라보노이드에 있어서 용혈억제 효과를 그들의 각각 구조적 특성과 상호비교 검토할 수 있었다. 확립된 광용혈 실험은 거의 대부분 컨트롤의 τ_{50}이 32분으로 재현성 있는 양호한 결과를 주었다.

2) 플라본의 영향

플라본은 3위치에 -OH기가 없는 플라보노이드이다. 플라본의 적혈구 용혈억제 효과는 Fig.9 및 Table 6에서 보는 바와 같다.

플라보놀에서와 같이 플라본도 농도 의존적으로 용혈을 억제하고 있으나 그 정도는 플라보놀에 훨씬 미치지 못하고 있다.

플라본 중에서 baicalein은 A환의 5,6,7,위치에 3개의 -OH기를 갖고 있으며 B환에는 -OH기가 없다. 적혈구 용혈억제 효과는 플라본 중 baicalein이 가장 컸으며($50\,\mu M$에서 $\tau_{50}=106$분), 이는 A환에 있는 3개의 -OH기가 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다. 또한 baicalein의 B환에 -OH 치환체가 없는 것은 플라보놀중 광용혈 억제효과가 제일 컸던 glangin의 경우도 마찬가지였으며 이들 공통된 B환 구조도 광용혈 억제효과와 관련이 있을 것으로 사료된다.

그외에 chrysin, apigenin, acacetin은 비슷한 정도로 광용혈 억제효과를 보여주고 있으며, apigenin의 B환에 있는 4'-OH기가 chrysin에는 없는 것으로 미루어 플라본의 경우는 4'-OH기의 광용혈에 대한 영향은 별로 없음을 알 수 있다.

Baicalein의 글리코시드인 baicalin은 A환의 7위치에 글루쿠론산이 결합된 글리코시드로서 $50\,\mu M$농도에서는 광용혈에 별 영향을 미치지 못하였으나 $100\,\mu M$의 농도에서는 명확하게 용혈을 촉진시켰다. Baicalin도 rutin의 경우와 마찬가지로 비교적 고농도에서 글루쿠론산 부분이 적혈구 막을 불안 정화 시켜 용혈을 촉진 시킬 가능성이 있는 것이 아닌가 사료된다.

플라본 중 치환체가 없는 flavone은 $25\,\mu M$로 부터 $1000\,\mu M$에 이르기까지 농도 의존적으로 적혈구의 용혈을 촉진시켰다(Table 6 및 Fig.10).

Flavone의 농도 증가에 따른 용혈촉진이 본 실험조건에서, flavone자체의 광증감

작용에 기인한 것인지를 확인하기 위하여 RB를 넣지 않고 용혈정도를 측정한 결과 100 μM, 1000 μM의 flavone이 첨가된 경우에 있어서 모두 광용혈이 일어나지 않았다 (Fig.11). 이와 같이 광용혈에 있어서 촉진작용을 나타내는 것으로 flavone 이외에 7,8-benzoflavone의 경우에서도 볼 수 있었다 (Fig.12). 이 결과로 부터 flavone 및 7,8-benzoflavone은 단독으로 $^1O_2$ 등을 발생시키는 광증감 작용은 없으나 RB등과 같은 광증감제와 더불어 광조사를 할 경우, 반응액 중에서 용혈을 촉진하는 매개체로 작용할 가능성은 충분히 있는 것이 아닌가 사료된다.

Quercetin, kaempferol, morin, chrysin등이 사람의 간 미크로솜에 첨가되었을 때는 benzo[α]pyrene(BP)히드록시화 반응이 수배나 활성화되었다는 보고들이 있으며 (Sousa & Marletta, 1985; Buening et al 1981; Conney, 1982), 또한 재 구성된 일산소화효소 (monooxygenase)계에서도 flavone처리로 BP 대사활성이 5배나 증가되었다는 보고를 참작할 때, flavone의 광용혈 촉진작용에는 cytochrome P-450의 활성화와 관계가 있을 가능성도 생각해 볼 수 있다.

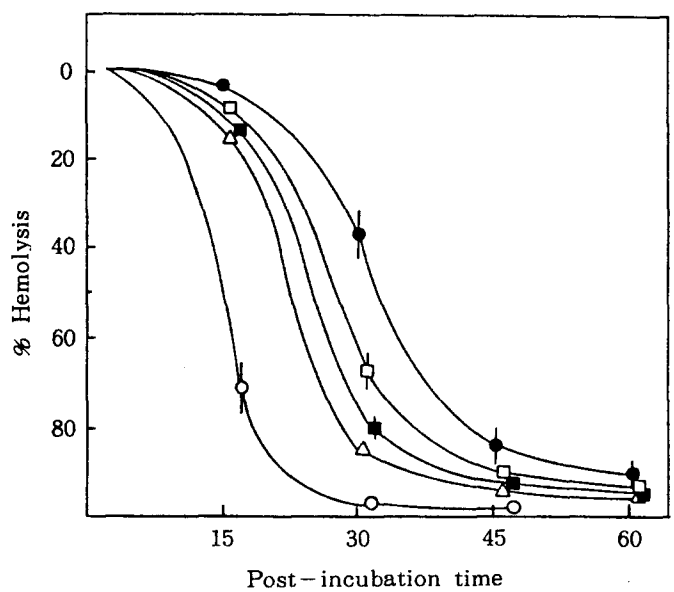


Fig.10 Dose effect of flavone on the rose-bengal sensitized photohemolysis of rabbit erythrocyte.

*Irradiation time ; 15min. *Pre-incubation time ; 30min. [rose-bengal]=1.5μM

Conc. of flavone :

●-● ; control □-□ ; 25μM ■-■ ; 50μM △-△ ; 100μM ○-○ ; 1000μM

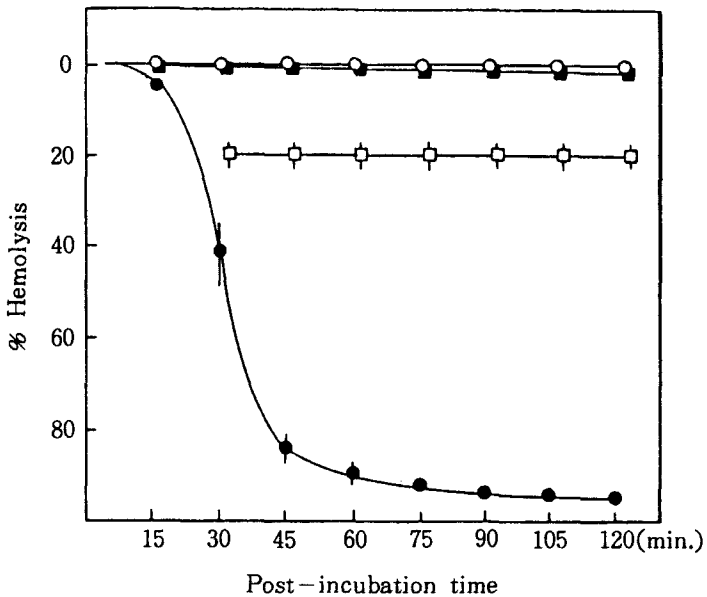


Fig. 11 Effect of flavone on rabbit erythrocyte.

*Irradiation time ; 15min.
*Pre－incubation time ; 30min.

■■ ; control　　○○ ; 100μM flavone
□□ ; 1000μM　　●● ; 1.5μM rose－bengal

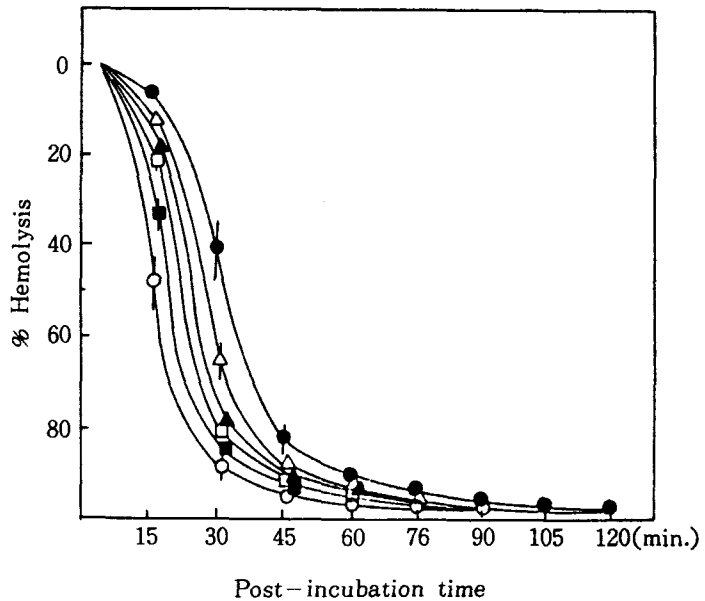


Fig. 12. Dose effect of 7,8－benzoflavone on the rose－bengal sensitized photohemolysis of rabbit erythrocyte.

*Irradiation time ; 15min.
*Pre－incubation time ; 30min. [rose－bengal]＝1.5μM
Conc. of 7,8－benzoflavone ;

●● ; control　　△△ ; 2.5μM
■■ ; 25μM　　○○ ; 50μM

3) 플라바놀 및 플라바논의 영향

플라바놀 및 플라바논은 모두 2위치에 이중결합이 없으며 이들은 또한 비 평면구조로 되어 있다(Mori et al, 1988).

광용혈에서 비 평면구조인 플라바놀 및 플라바논은 평면구조의 플라보노이드에 비하여 용혈억제 효과가 훨씬 작았다(Fig. 9, Table 6 및 부록 참고).

그러나 그중에서 예외적인 것으로서, 플라바놀 중에서 중에서 (+)-epigallocatechin gallate(EGCG)는 다른 플라바놀이나 플라바논과는 달리 광용혈 억제효과가 월등히 컸다(50 μM에서 τ_{50} = 400분).

EGCG는 여러 농도 범위(5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM)에서 $^1O_2$ 의한 적혈구 막 손상에 대하여 실험에 사용된 플라보노이드 중 galangin 다음으로 큰 보호효과를보였다(Fig.13). EGCG가 라디칼 소거활성에서는 (+)-catechin, (-)-epicatechin과 별 차이가 없고(Table 3), 용혈 억제 효과에서 큰 차이를 보이는 것은 3번 위치에 에스터로 결합된 galloyl기에 기인하는 것으로 사료된다.

Fig.14는 25 μM의 EGCG을 첨가한 경우와 25 μM의 (-)-epigallocatechin과 25 μM의 propyl gallate를 함께 첨가한 경우에 있어서의 광용혈에 미치는 영향을 비교 검토한 것이다.

Fig.14에서, EGCG는 Table 6 및 Fig. 9에 나와있는 바와 같이 현저한 용혈억제 작용을 보이고 있으나 (-)-epigallocatechin과 propyl gallate를 함께 첨가한 경우에는 τ_{50}이 40분으로 EGCG에 비교가 안될 정도로 용혈억제 효과가 저조하였다. 물론 propyl gallate도 비교적 고농도(500 μM, 1000 μM)에서는 효과가 있었다(Park, 1989). 여하튼 EGCG의 월등한 광용혈 억제효과에는 EGCG 분자중의 gallate부분에서만 유래되는 것은 아니며 전체 구조가 기여하고 있음을 알 수 있다.

그외에 플라바논인 hepereti n 및 narigenin은 50 μM농도 범위에서 광용혈 억제효과가 다른 플라보노이드에 비하여 미약하였다.

4) 플라바노놀의 영향

플라바노놀은 3위치 히드록시기와 4위치 카르보닐기 및 2위치의 이중결합이 없는 플라보노이드로서 전반적으로 광용혈 억제효과는 미약하였다(Fig.9, Table 6). 광용혈 억제효과는 aromadendrin, taxifolin < dihydrorobinetin < silybin순으로 증가하였다.

최근 플라바노놀에 속하는 silybin 및 silybin dihemisuccinate는 phalloidin, α-amanitin 및 사염화 탄소에 의한 간독성에 대하여 효과적인 보호제임이

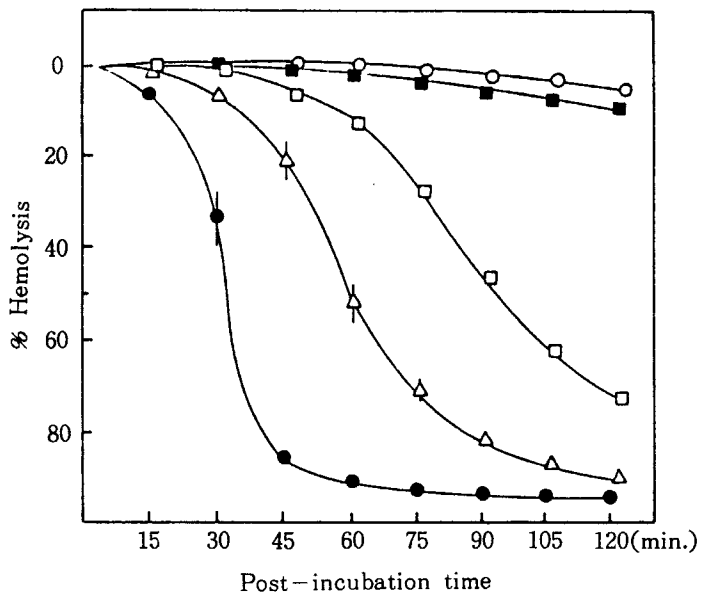


Fig. 13 Dose effect of(−)−epigallocatechin gallate on the rose−bengal sensitized photohemolysis of rabbit erythrocyte.

*Irradiation time ; 15min.

*Pre−incubation time ; 30min. [rose−bengal]=1.5μM

Conc. of(−)−epigallocatechin gallate ;

●−● ; control △−△ ; 5μM □−□ ; 10μM

■−■ ; 25μM ○−○ ; 50μM

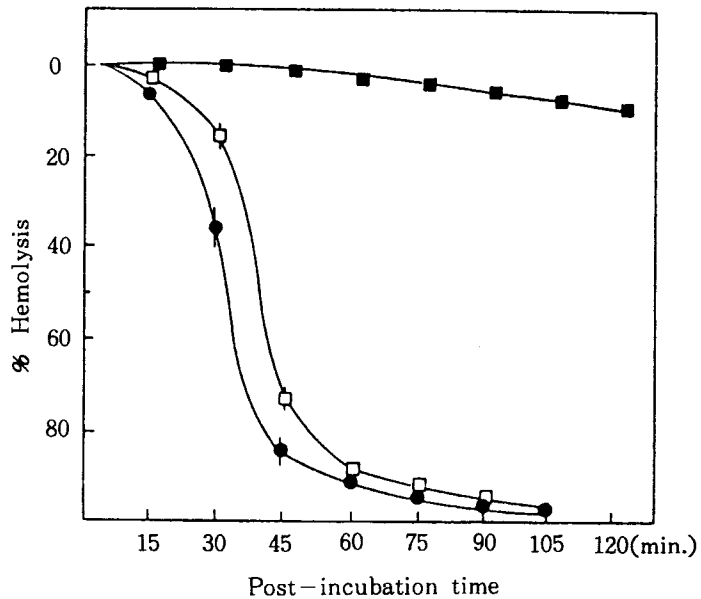


Fig. 14 Effects of (−)−epigallocatechin gallate and (−)−epigallocatechin plus propyl gallate on the rose−bengal sensitized photohemolysis of rabbit erythrocyte.

*Irradiation time ; 15min.

*Pre−incubation time ; 30min. [rose−bengal]=1.5μM

●−● ; control ■−■ ; 25μM. (−)−epigallocatechin gallate □−□ ; 25μM (−)− epigallocatechin plus 25μM propyl gallate

보고되고 있다(Valenzuela & Guerra, 1985). 비록 silybin의 보호 메카니즘이 설명되지는 않았지만 일반적으로 플라보노이드가 지질 과산화를 억제시켜 안정화 작용을 한다고 받아드려지고 있다. 적혈구 막에 대한 silybin의 효과는 최근 *in vitro*에서 페닐 히드라진에 의해 유발된 쥐(rat) 적혈구의 용혈에 대하여 silybin dihemisuccinate가 보호작용을 한다는 보고가 있을 뿐이다.(Valenzuela et al, 1985).

5) 플라보노이드의 첨가시기가 용혈에 미치는 영향

Fig.15은 quercetin의 첨가시기가 용혈에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 광조사 직후에 10μM 및 20μM이 되도록 적혈구 현탁액에 quercetin을 첨가한 경우는 광용혈 억제 효과를 전혀 나타내지 않았다. Quercetin의 농도가 100μM인 경우에 있어서도 컨트롤과 거의 차이가 없이 용혈이 진행되었다.

광조사 30분 전에 10μM 및 20μM이 되도록 quercetin이 첨가된 경우에 있어서는 τ_{50}이 각각 57분, 107분으로 이미 앞에서 기술한 바와 같이 현저한 용혈억제 효과를 보였다. 광조사 30분 전에 10μM, 광조사 직후에 10μM의 quercetin이 더 첨가된 경우(전체 20μM)에 있어서는 광조사 30분 전에 10μM이 되도록 첨가된 경우와 적혈구 용혈억제 효과가 같은 τ_{50}이 57분이었다.

Quercetin의 이와 같은 결과는 myricetin(50μM) 및 baicalein(100μM)의 경우에 있어서도 광조사 직후에 첨가되었을 경우에는 용혈억제 효과가 전혀 없었다(Fig. 16).

이와는 대조적으로 curcumin을 광조사 후에 첨가한(100μM) 경우에는 현저한 광용혈 억제 효과를 보였으며(Park,1989a), 또한 카로티노이드인 fucoxanthin 이 광조사 후에 첨가된 경우에는있어서도 용혈억제 효과가 있음이 보고되고 있다(Lee, 1988).

한편 광조사 후 히드록시 라디칼 제거제로 첨가된 만니톨(mannitol)등에 의한 용혈억제 효과를 본 실험에서도 만니톨의 농도가 1 mM이상인 경우에 있어서는 용혈억제 효과가 있었으며, 이는 광조사 후 적혈구 용혈에 반응성이 큰 산소 라디칼 등이 관여하는 암반응이 수반되고 있음을 시사한 바도 있다(Lee et al,1987c).

여하튼 광조사 후에 첨가된 플라보노이드는 본 실험조건에서 용혈에 아무런 영향을 미치지 못함을 알 수 있었고 이는 광조사중에 생성된 $^1O_2$에 의한 적혈구 막의 초기 손상이 결정적인 용혈요인이며, 플라보노이드는 막의 초기 손상을 억제함으로써 용혈억제 효과를 나타낸다고 볼 수도 있다.

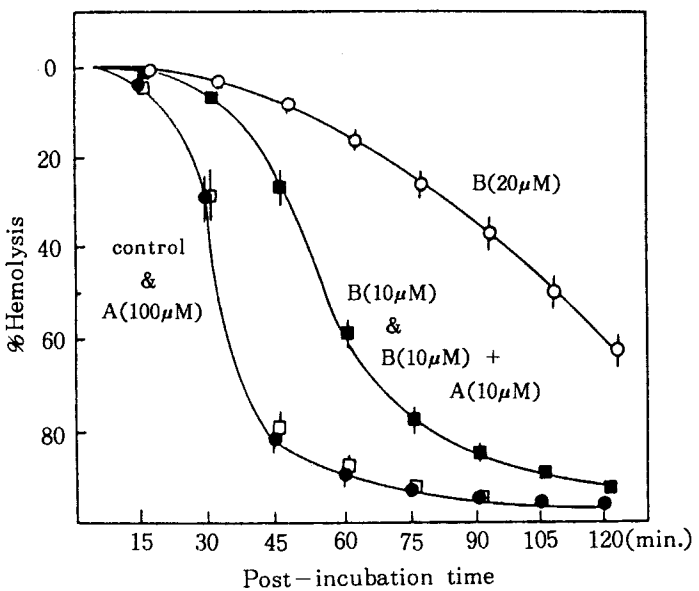


Fig. 15 Effect of quercetin on the rose-bengal sensitized photohemolysis.

*B ; Add quercetin before irradiation
A ; Add quercetin after irradiation
*Conc. of rose-bengal ; 1.5μM
*Irradiation time ; 15min.

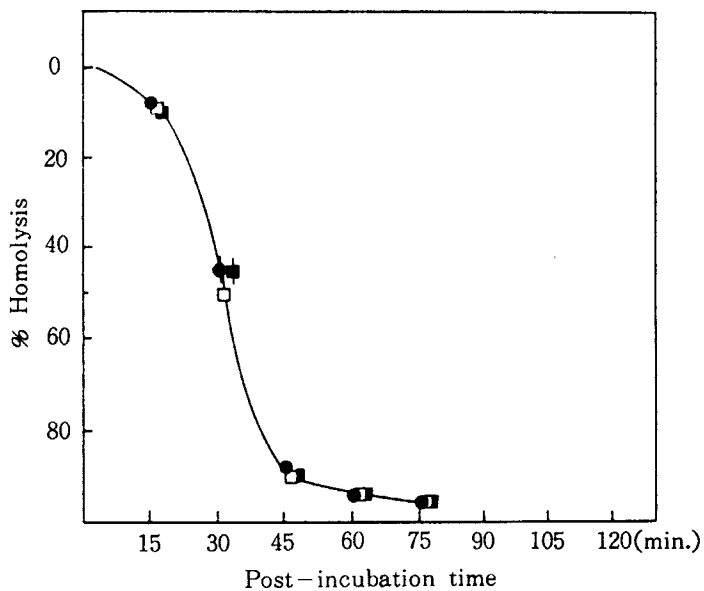


Fig. 16 Effects of myricetin and baicalein on the rose-bengal sensitized photohemolysis of rabbit erythrocyte.

*Irradiation time ; 15min. [rose-bengal]=1.5M

●-● ; control ■-■ ; 50μM myricetin
□-□ ; 100μM baicalein

*Myricetin and baicalein were added immediately after 15min. irradiation.

Ⅳ. 논　　의

폴라보노이드의 라디칼 소거 활성과 광용혈 억제

Singlet oxygen($^1O_2$)에 의한 적혈구의 광용혈 실험은 세포막의 구조, 기능, 대사에 관련된 연구 수단으로서 뿐만 아니라 스크리닝 테스트(screening test)로서, 혹은 적혈구 막에 대한 활성산소나 광에 의한 용혈 메카니즘을 이해하기 위한 최근 생화학적 연구의 주요관심의 대상이 되고 있다(Lee, 1987 b).

일반적으로 세포막에 존재하는 다가 불포화 지방산은 효소 또는 자동산화의 과산화에 의하여, 라디칼 연쇄반응을 경유하여 쉽게 산화될 수 있다(Rampley et al, 1976 ; Aust et al, 1982).

개시(Ⅰ)　$RH \rightarrow R\cdot$

전개(Ⅱ)　$R\cdot + {}^1O_2 \rightarrow ROO\cdot$

$ROO + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$

종결(Ⅲ)　$ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow$ inert product

$R\cdot + R\cdot \rightarrow$ inert product

$ROO\cdot + R\cdot \rightarrow$ inert product

이러한 막지질 과산화는 생체내에서 생성된 $^1O_2$ 뿐만 아니라 산소 라디칼 ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$)에 의해서도 개시될 수 있으며(Foote, 1976), 개시단계에서 $^1O_2$ 소광제 (quencher) 또는 라디칼 스캔빈져(scavenger)에 의하여 억제될 수 있다. 또한 전개 반응 (Ⅱ)도 페놀성 화합물 등의 과산화 라디칼 스캔빈져에 의하여 차단될 수도 있다(Burton et al, 1981).

$ROO\cdot + AOH \rightarrow ROOH + AO\cdot$

$^1O_2$은 막지질의 과산화 반응뿐만 아니라 단백질에 손상을 야기 시킬 수도 있다(Foote, 1976 ; Foote et al, 1984 ; Spector et al, 1979).

Fig.7에서 보는 바와 같이 적혈구 광용혈 실험에서 광조사중에 rosebengal에 의하여 생성된 $^1O_2$은 광조사 후에도 sigmoidal time curve로 광용혈을 촉진시키고 있다. 이는 $^1O_2$에 의해 막지질 또는 단백질의 손상이 유발됨을 보여주는 동시에 광조사 후, 즉 $^1O_2$의 공급이 중지된 후에도 $^1O_2$ 이외의 다른 인자에 의해 용혈이 진행될 수

있음을 시사하는 것으로 볼 수 있다.

이와같이 $^1O_2$은 직접 적혈구 막의 지질 및 단백질의 초기 손상을 유발하거나 활성이 큰 2차 반응종인 활성산소종(H_2O_2, ·OH) 및 유기(organic) 라디칼을 수반하는 암반응을 통하여 용혈을 진행시키고 있다(Park, 1989a).

생체반응에서 활성산소종 및 라디칼은 상호전환이 가능하며, 특히 활성산소중에서 산화력이 강한 ·OH는 O_2^-와 H_2O_2에서 철이온과의 킬레이트화가 관여되는 Fenton 반응(수정된 Harber-Weiss반응)에 의해 생성될 수 있다(Nakamura, 1980). 스캐빈저인 만니톨(mannitol)이 광조사 전 또는 후에 첨가된 경우에 농도 의존적으로 적혈구의 용혈을 억제 시키는 것으로 부터 광용혈의 암반응에서 ·OH이 관여하고 있음을 알 수 있다(Park, 1987, 1989a). 카탈라아제 또는 glutathione reductase는 농도 의존적으로 적혈구의 광용혈을 억제하고 있으며, 이는 $^1O_2$에 의한 적혈구 막의 초기 손상으로부터 반응성이 큰 2차반응종인 과산화수소의 생성이 수반됨을 의미하는 결과로 볼 수 있다.

적혈구의 광용혈은 간략하게 Fig.17과 같이 생각할 수 있다.

$$^0RB \xrightarrow{h\nu} {}^1RB \longrightarrow {}^3RB \xrightarrow{O_2} {}^0RB + {}^1O_2$$

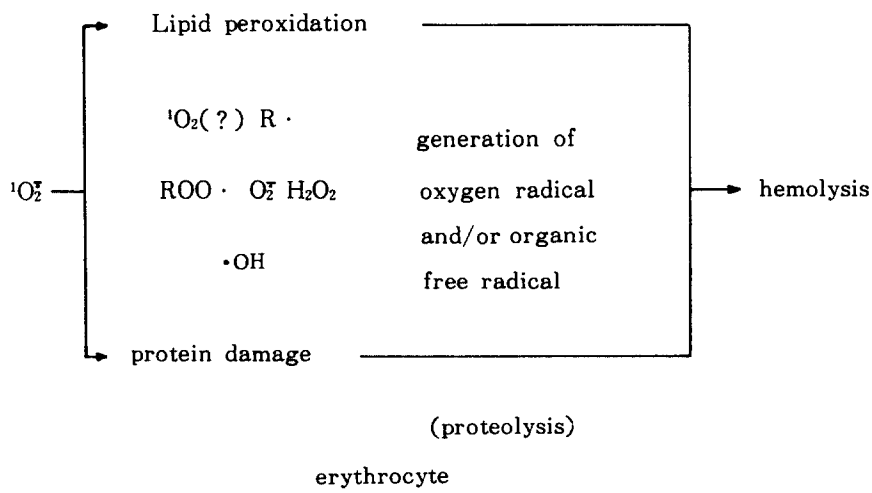


Fig. 17 Hemolysis of red blood cell by singlet oxygen.

$^1O_2$에 의한 적혈구 막의 손상은 활성 산소종 및 유기 라디칼의 계속적인 생성을 통하여 용혈을 가속화 시킨다. 이때의 플라보노이드는 O_2^- 소거 (Baumann et al,1980), $^1O_2$의 quenching(Sorata et al,1984) 및 라디칼 연쇄반응의 종결을 포함하는 과산화(peroxy) 라디칼(Torel, 1986)과 반응하므로 용혈을 억제할 수도 있다.

플라보노이드의 활성산소종 및 유기 프리 라디칼과의 반응성은 수소원자의 주게 (donor)로서의 성질을 나타낸다. 따라서 안정한 프리 라디칼인 DPPH를 사용하여 측정된 플라보노이드의 라디칼 소거 활성은 적혈구의 용혈 억제와 관련이 있을 것으로 간주된다.

Table 7 및 Fig.18은 각종 플라보노이드의 프리 라디칼(DPPH)소거활성과 토끼 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과(50 μM에서의 τ_{50})를 상호 비교한 것이다.

Narigenin, 3-hydroxy flavone, apigenin, baicalein, myricetin 의 경우는 라디칼 소거 활성이 증가할수록 용혈억제 효과도 증가하였다(r = 0.999).

	$[\log SC_{50}]^{-1}$	$\log\tau_{50}$
myricetin	1.10	2.20
baicalein	0.83	2.03
apigenin	0.32	1.71
3-hydroxy flavone	0.31	1.67
naringenin	0.21	1.61

Quercetin, silybin, hesperetin 등의 경우에도 라디칼 소거 활성이 용혈억제와 관련이 있었으며, 따라서 적혈구의 광용혈 억제는 라디칼 소거활성이 포함됨을 알 수 있다.

그러나 전반적으로 볼때 적혈구의 용혈 억제는 라디칼 소거활성은 차이가 거의 없으나 (SC_{50}이 각각 6.8, 7.5 μM) 세포보호 효과는 quercetin이 월등히 높았으며, baicalein과 baicalin의 경우도 동일한 경향을 보여주고 있다. 글리코시드인 플라보노이드는 본 실험조건에서 광용혈을 억제하지 못하거나 오히려 용혈을 촉진하는 경향을 보였는데 이는 아글리콘과는 대조적으로 글리코시드가 혈구막을 불안정화 시키기 때문으로 사료된다(Park, 1989a).

또한 kaempferol의 경우에 라디칼 소거활성 (SC_{50} = 15.9 μM)은 quercetin(SC_{50} = 6.8 μM)보다 떨어졌으나 용혈 억제에 있어서는 유사하였으며 (50 μM에서 τ_{50}이 각각 280분, 315분), myricetin의 경우에는 라디칼 소거활성은 높으나 (SC_{50} = 6.2 μM)

Table 7. Radical scavenging activity vs

compounds	SC_{50} 50%Scavenging conc.(μM)	$(\text{Log } SC_{50})^{-1}$	τ_{50} 50%Hemolysis at 50μM	Log τ_{50}
FLAVONOL				
galangin(1)	121	0.48	1020	3.01
quercetin(2)	6.8	1.20	315	2.50
kaempferol(3)	15.9	0.83	280	2.45
myricetin(4)	6.2	1.10	160	2.20
fisetin(5)	8.3	1.11	87	1.94
morin(6)	19.3	0.78	55	1.74
3-OH flavone(7)	1840	0.31	46	1.67
rutin(8)	7.5	1.23	32	1.50
FLAVONE				
baicalein(9)	15.8	0.83	106	2.03
apigenin(10)	1380	0.32	51	1.71
chrysin(11)	>5000	<0.27	50	1.70
baicalin(13)	17.5	0.80	26	1.41
flavone(14)	>50000	<0.21	25	1.40
FLAVANOL				
EGCG(15)	2.5	2.92	400	2.60
(-)-EPICATECHIN(16)	9.8	1.04	50	1.70
(+)-CATECHIN(17)	9.9	1.00	42	1.62
FLAVANONE				
naringenin(18)	51200	0.21	41	1.61
hesperetin(19)	645	0.36	37	1.57
silybin(20)	85.4	0.52	49	1.69
α -tocopherol	19.7	0.78	45	1.65

*EGCG ; (-)-epigallocatechin gallate

3-OH flavone ; 3-hydroxy flavone

용혈억제 효과(50μM에서 τ_{50}이 160분)는 kaempferol 및 quercetin보다도 현저히 낮은 것으로 나타났다. 특히 galangin은 라디칼 소거활성(SC_{50}이 121μM) 이 아주 작음에도 불구하고 용혈억제 효과는 실험에 사용된 플라보노이드 중에서 가장 큼을 보여주고 있다.

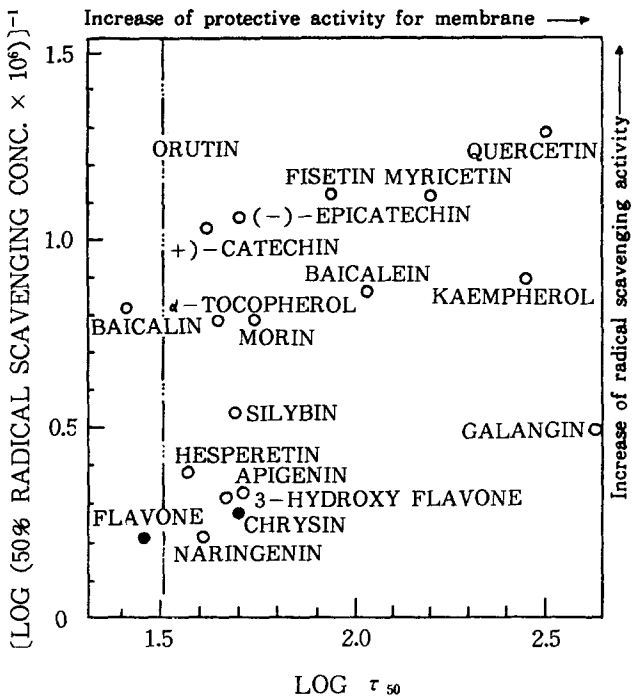


Fig.18. Plots of the inverse of the logarithm of the 50% radical scavenging conc. against the logarithm of half−time photohemolysis.

In photohemolysis ; 〔rose−bengal〕=1.5μM, 〔flavonoids〕=50μM, irradiation time=15min. Pre−incubation time=30min. rabbit erythrocyte used, dot−dash(−···−) ; control(τ_{50}=32min.)

In radical scavenging activity ; radical scavenging=diphenyl picrylhydrazyl, measured absorbance at 517min.

● ; Under the valus shown in radical scavenging activity.

그외 플라바놀인 (+)-catechin과 (−)-epicatechin도 SC_{50}이 각각 9.9μM, 9.8 μM로 라디칼 소거활성이 kaempferol보다 높으나, 광용혈 억제효과는 비교가 안될 정도로 낮았으며, kaempferol과 라디칼 소거활성이 비슷한 baicalein, morin, 기타 라디칼 소거제로 잘 알려진 α-tocopherol은 세포보호 효과가 α-tocopherol < morin < baicalein < kaempferol 순으로 증가한다. 기타 세포보호 효과 및 라디칼 소거 활성 모두에 기여정도가 비교적 적은 그룹중에서 hesperetin은 SC_{50}이 645 μM로 apigenin 1380, chrysin > 5000, naringenin 51200 보다도 라디칼 소거 활성이 큰 반면 적혈구 용혈 억제 효과는 제일 작음을 볼 수 있다. 비슷한 경우로 sil-

ybin도(SC_{50} = 85.4 μM) 라디칼 소거 정도가 apigenin, chrysin보다 크지만 용혈 억제 효과는 떨어졌다.

플라보노이드는 활성산소종을 소거할 뿐 아니라 각종 산화 환원 효소를 저해하는 것으로 알려져 있으며 최근에는 lipoxygenase, cyclooxygenase 및 phospholipaseA_2등 세포의 동적기능에 중요한 역할을 하고 있는 효소에 대한 플라보노이드의 저해 작용에 관한 연구 보고도 나오고 있다(Alcaraz et al, 1985 ; Yoshimoto et al, 1983 ; Kimura et al, 1986 b ; Bauman et al, 1980a ; Bauman et al 1980b ; Hsieh et al, 1988).

이에 연구자들은 광증감 작용에 의한 적혈구 광용혈 메카니즘에 이들 효소들의 작용이 수반될 가능성 여부와 플라보노이드의 광용혈 억제 작용이 이들 효소의 저해 효과와 관련이 있는지를 검토하기 위하여 플라보노이드의 광용혈에 미치는 영향 및 라디칼 소거 활성 이외에도, lipoxygenase, cyclooxygenase 및 phospholipaseA_2의 저해 활성을 비교 검토하였다. 아울러 indomethacin, diclofenac sodium, aspirin, mefenamic acid등의 cyclooxygenase의 저해제, lipoxygenase 저해제인 nordihydroguaiaretic acid, phospholipaseA_2저해제인 mepacrine 및 methyltransferase저해제인 colchicine이 광용혈에 미치는 영향과 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, 아스코르빈산 등 활성산소종에 대한 적혈구 광용혈 억제 효과에 선택성이 있다고 인정되는 화합물들이 광용혈에 미치는 영향, 그리고 플라보노이드의 혈구막과의 친화성 및 가용화된 플라보노이드의 분광학적 성질등을 종합적으로 비교 검토하였다(Park 1989a, 1989b). 아직 그 메카니즘이 명확하게 밝혀지지 않고 있는 활성산소종에 의한 적혈구막의 파괴에 있어서 활성산소종에 의한 직접적인 과산화 작용보다도 산화효소의 활성화가 선행되어 적혈구막의 손상이 일어난다는 새로운 광용혈 메카니즘을 제안한 바 있다(Park, 1989a). 또한 플라보노이드 및 기타 페놀성 화합물의 광용혈 억제 효과는 라디칼 소거활성뿐 아니라 아라키돈산 cascade에 관련된 효소 저해 활성과 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다 (Park, 1989a, 1989 b).

V. 결 론

생체내에서 생성되는 활성산소종 및 유기 자유 라디칼은 세포막의 손상, 돌연변이 유발, 발암, 조직의 노화등의 원인이 된다는 점에서 활성산소가 세포막에 미치는 영향과 그 메카니즘을 이해함은 매우 중요한 일이다.

최근 quercetin등의 몇몇 플라보노이드가 항산화 작용이 있고 lipoxygenase와 cyclooxygenase에 대한 억제 작용이 있음이 주목되고 보다 강력한 항산화제의 개발과 두 산화효소에 대해 선택적인 억제제 발견을 목적으로 하는 천연물 탐색 연구가 활발히 진행되고있다.

본 연구에서는 (-)-Epigallocatechin gallate(EGCG)등 천연산 24종의 플라보노이드에 대하여 라디칼 소거 활성 및 적혈구의 광용혈에 미치는 영향등을 조사하였다. superoxide dismutase(SOD), catalase등의 효소와 아스코르빈산 및 아라키돈산 cascade에 관련된 각종 효소 저해제들이 광용혈에 미치는 영향, 플라보노이드의 lipoxygenase저해 활성을 조사한 선행 연구(Park, 1989a)의 결과와 함께 정리하면 다음과 같다.

1. 실험에 사용된 24종의 플라보노이드중 galangin의 광용혈 억제 효과가 가장 컸으며 다음으로는 EGCG로 그 효과가 컸고, 플라본중에서는 baicalein이 우수한 효과를 보였으며 치환체가 없는 flavone 및 7,8-benzoflavone은 농도 의존적으로 용혈을 촉진시켰으며 글리코시드는 용혈 억제 효과가 없었다.

2. 라디칼 소거 활성은 플라보노이드중 EGCG가 가장 컸으며 ($IC_{50}=2.5\mu M$) 다음으로 플라보놀 및 플라바놀이 큰 활성을 보였다. 글리코시드 및 아글리콘의 라디칼 소거 활성간에는 거의 차이가 없었고(quercetin, rutin : baicalein, baicalin), flavone 및 naringenin은 활성이 거의 없었다.

3. Soybean lipoxygenase 저해활성은 EGCG가 가장 컸으며 ($IC_{50}=4\mu M$) 그 다음으로 플라보놀이 높은 저해 활성을 보였다(Park, 1989a).

4. 적혈구의 광용혈에 SOD에 의한 용혈 억제 효과는 나타나지 않았으며 catalase 및 glutathione reductase는 현저한 용혈 억제 효과를 보여 주었다. SOD는 galangin등 플라보노이드의 광용혈 억제 효과를 변화시키지 못하였다(Park, 1989a).

5. Quercetin등의 플라보노이드의 광용혈 억제 효과는 아스코르빈산의 첨가로 상승되었다(Park, 1989a).

6. 광조사 직후 첨가된 플라보놀은 광용혈 억제 효과를 나타내지 못했다.

이들 실험 결과로 부터 항산화 작용과 막 보호작용이 일치하는 것(A:일부의 플라보노이드 및 페놀산 유도체)과 비교적 일치하지 않는 것(B:galangin, kaempferol, EGCG)의 두 계열로 그 물질들을 분류할 수 있었다. 또한 lipoxygenase 또는 cyclooxygenase의 저해제기들이 B계열 물질들의 거동과 유사점이 매우 크게 나타났으며 이 계열 물질이 산화효소의 저해제로 작용함으로써 막 보호 활성을 나타내고 있음을 파악할 수 있었다. 즉,

7. Singlet oxygen에 의하여 유도된 적혈구 광용혈은 아라키돈산 cascade에 포함된 효소들의 작용이 수반되고 있었으며, 플라보노이드 및 기타 페놀성 화합물의 광용혈 억제효과는 라디칼 소거 활성보다는 이들 효소들에 대한 저해 활성에 밀접한 관계가 있었고, 이들 효소들에 대한 저해 활성이 큰 화합물일 수록 광용혈 억제 효과가 크게 나타났다. 따라서 아직 그 메카니즘이 명확하게 밝혀지지 않고 있는 활성 산소종에 의한 적혈구막의 파괴에 있어서 이들 산화 효소의 활성화가 선행되어 적혈구막의 손상이 일어난다는 새로운 메카니즘을 제안하였다(Park, 1989a).

본 연구에서는 여러개의 새로운 항산화제를 밝혔고, 아울러 광용혈 실험이 산화 효소의 억제 또는 활성화 물질을 탐색하는 데 지극히 간편하고 재현성이 큰 새로운 진단 방법으로 이용될 수 있음을 알았다.

REFERENCES

Alcaraz, M.J., Hoult, J. R. S.,(1985), Arch. Int. Pharmacodyn. **278** : 4

Aust, S. D. and Svingen, B. S.(1982) in Free Radicals in Biology(Pyror, W. A., ed) Vol.5, ppl-28 Academic Press, New York.

Barz, W., Wiermann, R.(1981) ; in Proc. Int. Bioflavonoid Symp., pp185

Barz, W., Koster, J., Weltring, K.-M., Strack, D.(1985) Ann. Proc. phytochem. Soc. Eur., **25** ; 307

Baumann, J., Wurm, G. and Bruchhausen, F.V.(1980a), Arch. Pharm. **313** ; 330

Baumann, J., Bruchhausen, F. V. and Wurm, G.(1980b) Prostaglandins, Vol. **20** ; No.

4 ; 627

Bensath, A., Rusznyak, St., Szent-Gyorgyi, A., (1936) Nature, **138**, 798(1936)

Blackburn, W.D., Jr., Heck, L.W., Wallance, R.W.(1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., **144** ; 1229

Buening, M.K., Chang, R.L., Huang, M.-T., Fortner, J.G., Wood, A.W. and Conney, A. H.(1981) Cancer Research,**41** ; 67

Burton, G.W. and Ingold, K. U.(1981) J. Am. Chem. Soc. **103** ; 6472

Conney, A.H.(1982), Cancer Research, **42** ; 4875

Davies, K.J.A. and (1987a) J. Biol. Chem., **262**(20) ; 9895

Davies, K.J.A. and Delsignore, M.E., and Lin, S.W.(1987b) **262**(20) ; 9902

Davies, K.J.A. and Delsignore, M.E.(1987c) **262**(20) ; 9908

Davies, K.J.A. and Lin, S.W. and Pacifici, R.E.(1987d) **262**(20) ; 9914

Foote, C.S. and Denny, (1968), J. Am. Chem. Soc., **90** ; 6233

Foote, C.S. (1976) in Free Radicals in Biology(Pryor, W.A. ed) Vol. Ⅱ pp85-133, Academic press, New York.

Foote, C.S., Shook, F.C. and Abakerli, R.B.(1984) Methods Enzymol. **105** ; 36

Foote, C.S.(1982) "Pathology of Oxygen"(A.P. Autor, ed), Academic Press, N.Y., 21

Havsteen, B.(1983), Biochem. Pharmac., 321141

Horiuchi, T., Fujiki, H., Hakii, H. Suginuma, M.(1986) Jpn. J.Cebcer Res., **77** ; 526

Hsieh, R.J., German, J.B. and Kinesella, J.E.(1988) Lipids, Vol.**23**, No.4 ; 322

Husain, S.R., Cillard, J. and Cillard, P.(1987) Phytochemistry, Vol. **26** ; 2489

Kimura, Y., Okuda, H., Nomura, T., Fukai, T. and Arichi, S.(1986a) Chem. Pharm. Bull. **34(3)** ; **1223**

Kimura, Y., Okuda, H.(1986b) J.Natl. Products. 49(4) 639

Klebanoff, S.J.(1980), Ann. Int. Med., **93** ; 480

Krinsky, N.I.(1979), "Singlet Oxygen", Academic Press, N.Y., 597

Krinsky, N.I.(1982), Pure and Appl. Chem., **51** ; 649

Lee, T.Y., Park, S.N. and Lee, J.W.(1984a) Journal of the College of Education, Seoul National University, **9** ; 285

Lee, T.Y., See, D.H. and Park, S.N.(1984b) J. Korean Agr. Chem. Soc., **27** ; 1

Lee, T.P., Matteliano, M.C. and Middleton, E.(1982), Life Sci. **31** ; 2765

Lee, J.W., Lee, T.Y., Mo, S., Lee, J.H., Lee, D.H., Park, S.N. and Lee, B.K.(1987a) J.Korean Biochem. J., **20** ; 378

Lee, T.Y., Lee, D.H.(1987b) Journal of the College of Education Seoul National University,

34 ; 121
Lee, T.Y., Lee, D.H., and Park, S.N.(1987c) Photochem. Photobiol. 45 Supplement ; 10s
Lee, D.H.(1988), Ph. D. Thesis, Seoul National University
Leibovitz, B.E. and Siegel, B.W.(1980) J. Geontel., 35 ; 45
Matuura, T., Matsushima, H., Nakashima, R.(197) Tetrahedron, 26 ; 435
Miller, E., Schreier, P.(1985) Food Chem. 17 ; 143
More, A., Nixhino, C., Enoki, N. and Tawata, S.(1988) Phytochem. 27(4) ; 1017
Murali, N.S., Teramura, A.H.(1985) Physiol. Plant., 63 ; 413
Nakamura, T.(1980) Oil Chem., 29(5) ; 309
Nasr, C., Pincemail, J., Brasseur, T., Deby, C., Haag, M., Angenot, L. Anton, R.(1987) Ind. Int. Symp. on Plant Flavonoids in Biology and medicine, p69
Nishino, H., Iwashima, A., Fujiki, H. Suinuma, T.(1984) Jpn. J. Cancer Res., 75, 113
Park, S.N.(1984a), "Quenching Effects of Carotenoids on Singlet Oxygen" Master Thesis, Seoul National University.
Park, S.N., Leed, T.Y.(1984b) J. Soc. Cos. Chem. Korea No.10 ; 75
Park, S.N., Lee, D.H., Lee, T.Y.(1987) J. Soc. Cos. Chem. Korea No.13, 45
Park, S.N.(1989a), "Effects of Flavonoids and Other phenolic Compounds on Reactive Oxygen-mediated Biochemical Reactions" Ph. D. Thesis, Seoul National University
Park, S.N.(1989b), Abstract of the Annual Meeting of Korean Agr. Chem. Soc., 12
Pincemall, J., Deby, C., Lion, Y., Braquet, P., Hans, P., Drieu, K., Goutier, R.(1985) in Flavonoids and Bioflavonoids(eds. Farkas, L., et al) pp423, Elsevier, Amsterdam
Rampley, D.N. and Hasnip, J. A.(1976) J. Oil. Col. Chem. Assoc. 59 ; 356
Rusznyak, St., Szent-Gyorgyi, A.(1936) Nature 108 ; 27
Sorata, Y., Takahama, U. and Kimura, M.(1984), Biochem. Biophys. Acta. 799 ; 31
Sousa, R.L. and Marletta, M.A.(1985) Archives of Biochemistry and Biophysics. 240 (1) ; 345
Spector, A., Garner, M.H., Garner, W.H., Roy, D., Farnsworth, P., and Shyne, S.(1979) Science. 204 ; 132B
Straight, R.C. and Spikes, J.D.)1985), "Singlet Oxygen, Vol. Ⅳ, Reaction Modes and Product, Part 2". (Frimer, A.A. ed)
Takahama, U.(1984a), Plant Physiol., 74 ; 852
Takahama, U. (1984b), Plant Cell Physiol., 25 ; 1181
Takahama, U., Youngman, R.J., Elsther, E.F.(1984C), Photobiochem. Photobiophys, 7 ; 175-181

Takahama, U. (1983a) Plant Physiol., **71** ; 598
Takahama, U.(1983b) Photochem. Photobiol., **38** ; 363
Tomimori, T., Miyaichi, Y. and Kizu, H.(1982) Yakugaku Zasshi **102** ; 388
Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P.(1986), Phytochemistry **25**(2) ; 383
Ueno, I., Kohno, M., Haraikawa, K., Hirono, I.(1984), J. Pharm. Dyn, **7** ; 798
Valenzuela, A. and Guerra, R.(1985) FEBS Letters **181**(2) ; 2281
Valenzuela, A., Barria, T., Guerra, R. and Garrido, A.(1985) Biochem. Biophysic. Res. Comm. **126**(2) ; 712
Yoshimoto, T., Furukawa, M., Yamamoto, S., Horie, T. and Watanabe-Kohno, S.(1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. **116**(2) ; 612
Younes, M., Siegers, C.-P.(1981) Planta Medica, **43** ; 240

ABSTRACT

Protective effects of flavonoids on cell membrane in the photohemolysis experiments.

The protective effects of 24 flavonoids against singlet oxygen-induced photohemolysis of rabbit erythrocytes were investigated and compared with their antioxidant activities.

1. All the flavonoid aglycons investigted besides flavone and 7,8-benzoflavone showed thd dose-dependant protective effects. Especially galagin showed the most pronounced effect under the experimental condition.

2. The order of the radical-scavenging activities of flavonoids was as follow (-)-EGCG>flavonols>flavanols>flavones>flavanonols. The radical-scavenging activities of flavonoid glycosides were not different from those of their aglycons.

3. When added after irradiation, flavonoids did not alter the photohemolysis pattern of control.

In this study, several antioxidant were found and it was newly found that photohemolysis experiment is a convenient, reproductive diagnostic method in the screening and researching the compound which has antioxidant activity or protective effect on cell membrane against active oxygen species.