

포공영의 자유라디칼 소거 및 간세포 보호활성

백 흠 영*

정우약품공업주식회사

In Vitro Free Radical Scavenging and Hepatoprotective Activities of *Taraxacum mongolicum*

Hum-Young Baek*

Jungwoo Pharmaceutical Co., Ltd., Asan, Chungchungnam-do 135-270, Korea

Abstract – The methanol (MeOH) extract and its fractions of *Taraxacum mongolicum* (Compositae) were examined for their scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-phenylhydrazyl (DPPH) and superoxide radicals, and hepatoprotective effects on tacrine-induced cytotoxicity in human hepatoma cell line, Hep G2 cells. Both methylene chloride (CH₂Cl₂) and butanol (*n*-BuOH) soluble fractions of the MeOH extract showed the free radicals scavenging and hepatoprotective effects. From these results, it is suggested that hepatoprotective effect of these fractions partly relies on their free radical scavenging activity.

Key words – *Taraxacum mongolicum*, Compositae, 1,1-diphenyl-2-phenylhydrazyl, superoxide radical, hepatoprotective, Hep G2 cells

생체내에서 자유 라디칼 반응에 의해 생성되는 superoxide 및 hydroxyl radical 등의 활성산소종은 일반적으로 식세포에 의한 박테리아 제거를 비롯한 생체방어에 중요한 역할을 하며, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase 등에 의해 조절되고 있다. 그러나, 병적으로 과량 생성되는 경우 이들 자유라디칼은 생체막의 불포화 지방산을 공격하여 생체막 과산화 지질을 일으키고, 이는 노화, 발암, 간질환 및 동맥경화 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁾ 따라서, 현재 산화적 스트레스로부터 생체막을 보호할 수 있는 새로운 항산화제의 발견을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

간질환 치료제 개발을 위해 사용되고 있는 사염화탄소를 비롯한 간 독성 유발물질은 일상생활에서 인간이 접촉하기 어려운 물질들이다. 따라서, 실제로 인간이 접하기 쉬운 간 독성 유발물질을 사용하여 간보호물질을 검색하는 것이 일면 합리적인 방법으로 여겨지고 있다. 예로서 간독성의 부작용이 알려진 의약품들 들 수 있다. Tacrine(1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine hydrochloride)은 acetylcholinesterase 저해작용을 가지는 알츠하이머 질환 치료제로 이용되고 있

으나, 가역성 간 독성을 유발하는 부작용 때문에 임상적 이용이 제한되고 있으며,²⁾ 산화적 스트레스가 이 약물의 간 독성 유발기전 중의 하나로 생각되고 있다.³⁾ 저자 등은 천연물로부터 간보호활성을 탐색할 목적으로 DPPH 및 superoxide 라디칼 소거효과와 tacrine으로 독성을 유발한 인간 간암 세포주인 Hep G2 세포에 대한 보호효과를 검토하여 포공영(*Taraxacum mongolicum* H. Mazz) 메탄올 추출물의 CH₂Cl₂과 BuOH분획물이 유의한 결과를 나타내 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 – 포공영은 2001년 5월 익산시 인근에서 채집하였으며 원광대학교 자연식물원에서 감별하였다. 채집한 식물 전초를 음건한 다음, 분쇄하여 분말로 하여 사용하였다.

시약 및 기기 – DPPH, tacrine, L-ascorbic acid, Trolox, silybin, MTT 시약은 Sigma사에서 구입하였으며, superoxide dismutase (SOD) assay kit-WST는 Dojindo molecular technologies, Inc. (일본) 제품을 사용하였다. FBS는 Hyclone사에서, RPMI medium 1640, trypsin-EDTA, antibiotic은 Gibco life technologies사에서 구입하였다. 흡광도는 UV-Vis recording spectrophotometer (Amer Sham Pharmacia

*교신저자(E-mail) : bhy0323@lycos.co.kr
(FAX) : 041-541-0470

Biotech, U.S.A.)를 사용하여 514 nm에서 측정하였고, ELISA-kinetic microplate reader (Molecular Devices, U.S.A.)를 사용하여 405 및 540 nm에서 측정하였다. 기타 시약과 용매는 모두 국산 특급을 사용하였다.

추출물 및 성분분획의 제조 - 포공영 분말(1.2 kg)을 메탄올로 2회 가열 추출하고 여액을 감압농축하여 메탄올 추출물(136.9 g)을 얻은 후 60% 수성 메탄올에 녹이고 *n*-hexane 및 CH₂Cl₂로 순차 분획하였으며, 수성 메탄올 층은 다시 감압농축하여 용매를 제거한 후에 이를 다시 증류수에 녹인 다음 BuOH로 분획하였다. 수득량은 *n*-hexane 분획 19.2 g, CH₂Cl₂ 분획 3.0 g, BuOH 분획 6.8 g, 수성 분획 98.7 g이었다.

DPPH 라디칼 소거활성 검색⁴⁾ - 0.1 mM DPPH 에탄올 용액 (1 ml), 에탄올 (1 ml), 0.05 M Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4; 0.95 ml)의 혼합용액에 시료 에탄올 용액 (50 µl)을 넣고 실온에서 30분간 반응시켜 각 반응액의 흡광도를 517 nm에서 측정하였다. 대조구로는 시료 대신 에탄올을 넣어 시료의 흡광도 감소 정도를 검토하였으며, DPPH 라디칼을 50% 소거시키는 시료의 농도를 IC₅₀치로 나타내었다. 시료는 단계별로 희석한 4가지 농도를 이용하였으며, 각각 3회 측정하여 평균치를 구하였다. 양성 대조약물로는 L-ascorbic acid를 사용하여 DPPH 자유라디칼 소거활성을 비교하였다.

Superoxide 라디칼 소거활성 검색 - Dojindo molecular technologies사 제품 사용서에 준하여 실험하였으며, 간단히 설명하면 다음과 같다. 농도별로 희석한 시료용액 (1, 5, 10 µg/ml)을 96 well plate에 20 µl씩 넣은 후 reagent working 용액 (200 µl)과 enzyme working 용액 (20 µl)을 각각 넣고 37°C에서 20분 동안 방치한 다음 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료대신 증류수를 사용하였으며, 양성 대조약물로는 Trolox를 사용하였다.

SOD activity (inhibition rate, %)=

$$[(S1-S3)-(SS-S2)/(S1-S3)] \times 100$$

S1: slope of blank 1 S2: slope of blank 2

S3: slope of blank 3 SS: slope of sample

Tacrine 유발 독성에 대한 간세포 보호활성 검색 - 인간 간암 세포주인 Hep G2 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받아 계대 배양하여 사용하였다. 배지는 penicillin G (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml)이 포함된 RPMI-1640으로 FBS를 전체양의 10%가 되도록 혼합한 다음 pH 7.4로 조절한 뒤 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리시키고 각 well당 2 × 10⁵ cells/ml가 되도록 96 well plate에 분주하여 CO₂ incubator에서 24시간 예비 배양하였다. 농도별로 희석한 시

료용액 (1, 10, 50, 100, 200 µg/ml)과 tacrine (1 mM)을 처리한 후 CO₂ incubator에서 2시간 동안 배양하고 MTT assay를 실시하였다.

MTT assay - PBS에 용해한 MTT용액 (5 mg/ml)을 50 µl씩 가하고 CO₂ incubator에서 4시간 동안 방치하고 상등액을 제거한 뒤 DMSO 150 µl를 넣고 10분간 shaking하여 formazan을 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 실험은 3회 이상 반복하여 각각의 평균치로 EC₅₀ 값을 계산하였다. 양성 대조약물은 silybin을 사용하였다.

결과 및 고찰

천연물로부터 간 보호 활성물질을 발견할 목적으로 예비 검색을 실시한 결과 포공영 (*T. mongolicum*)의 메탄올 추출물이 tacrine으로 독성을 유발한 인간 간암 세포주인 Hep G2에 대하여 보호효과 (EC₅₀=183.55 µg/ml)를 나타냄을 알 수 있었다. 활성분획을 추적하기 위하여 메탄올 추출물을 용매분획하여 각각 *n*-hexane, CH₂Cl₂, BuOH 및 물 가용부를 얻은 다음 이들의 간 세포 보호효과를 검토한 결과 CH₂Cl₂ 분획물 (EC₅₀=47.6 µg/ml) 및 BuOH 분획물 (EC₅₀=167.41 µg/ml)이 활성을 나타내었다 (Table I). 가장 높은 활성을 나타낸 CH₂Cl₂ 분획물은 양성 대조약물로 사용한 silybin의 EC₅₀치 (33.28 µg/ml)와 비교할 때 유의성이 있는 것으로 판단되었다. 한편, 본 연구에서 간 세포독성 유발물질로 사용한 tacrine은 산화적 스트레스가 간 독성 유발 기전 중의 하나로 보고되어 있어,³⁾ 포공영 메탄올 추출물 및 분획물에 대하여 DPPH 및 superoxide 라디칼 소거능을 검토하였다.

포공영 메탄올 추출물은 DPPH라디칼 소거능 (IC₅₀ > 100 µg/ml)을 나타내지 않았으나, Hep G2 세포주를 이용한 간 세포 보호활성 검색에서 활성이 인정된 CH₂Cl₂ 분획물 (IC₅₀=38.52 µg/ml) 및 BuOH 분획물 (EC₅₀=18.77 µg/ml)에서는 유의한 자유라디칼 소거능이 인정되었다 (Table I). 양성 대

Table I. Free radical scavenging and hepatoprotective effects of the MeOH extract of *T. mongolicum* and its fractions

Samples	DPPH (IC ₅₀ : µg/ml)	SOD (IC ₅₀ : µg/ml)	Hep G2 (IC ₅₀ : µg/ml)
MeOH extract	>100	8.68	183.55
Hexane fraction	>100	>20	>200
CH ₂ Cl ₂ fraction	38.52	9.30	47.60
BuOH fraction	18.77	6.46	167.41
Aqueous fraction	>100	>20	>200
L-Ascorbic acid	8.85	-	-
Trolox	-	13.1	-
Silybin	-	-	33.28

조약물로 L-ascorbic acid를 사용하였으며, IC_{50} 치는 8.85 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 안정한 합성 자유라디칼인 DPPH에 대한 소거능은 지질과산화의 억제와 상관성이 있는 것이 밝혀져 있으며,⁴⁾ 본 연구에서도 유사한 관련성을 나타내었다.

Superoxide 라디칼은 식세포에 의한 박테리아 제거에 있어서 중요한 인자로 작용하지만, 과량 생성될 경우 산화적 스트레스를 유발하여 세포손상을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ Superoxide 라디칼 소거능과 포공영 추출물 및 분획물의 간 세포 보호활성과의 관련성을 관찰할 목적으로 이들의 superoxide 라디칼 소거활성을 검토한 결과, 포공영 메탄을 추출물 (IC_{50} =8.68 $\mu\text{g/ml}$), CH_2Cl_2 분획물 (IC_{50} =9.30 $\mu\text{g/ml}$) 및 BuOH 분획물 (EC_{50} =6.46 $\mu\text{g/ml}$)이 양성 대조약물로 사용한 vitamin E 유도체인 Trolox의 소거능 (IC_{50} =13.1 $\mu\text{g/ml}$)에 비하여 우수함을 알 수 있었다 (Table I).

비록 인간 간암 세포주인 Hep G2 세포에 대하여 가장 높은 보호율을 나타낸 포공영 메탄을 추출물의 CH_2Cl_2 분획물이 DPPH와 superoxide 라디칼 소거활성시험에서는 BuOH 분획물에 비하여 낮은 효과를 나타내었으나, 간 세포 보호활성을 나타낸 이들 2개의 분획만이 자유라디칼 소거능을 보임으로서 포공영 메탄을 추출물의 CH_2Cl_2 및 BuOH 분획물의 간 세포 보호활성은 어느 정도 그들의 자유라디칼 소거능에 기인하는 것으로 추정되며, 추후 활성물질을 밝혀낼 계획이다.

결 론

간 독성을 나타내는 알츠하이머 치료제인 tacrine에 의하여 유발되는 인간 간암 세포주, Hep G2 세포사멸에 대한

보호효과를 나타낸 포공영 메탄을 추출물로부터 활성물질을 발견하기 위한 예비연구로서 분획물들에 대한 간 세포 보호활성, DPPH 및 superoxide 라디칼 소거능을 검토한 결과, CH_2Cl_2 및 BuOH 분획물에 간 세포 보호 및 자유 라디칼 소거활성을 가지는 유효성분이 함유되어 있음을 추정할 수 있었다. 앞으로 이들 분획으로부터 활성성분의 분리가 필요할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and anti-oxidant therapy. *Lancet*, **23**: 1396-1397.
- Watkins, P. B., Zimmerman, H. J., Knapp, M. J., Gracon, S. I., and Lewis, K. W. (1994) Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimers disease. *J. Am. Med. Assn.* **271**: 992-998.
- Osseni, R. A., Debbasch, C., Christen, M. O., Rat, P., and Warnet, J. M. (1999) Tacrine-induced reactive oxygen species in a human liver cell line: the role of anethole dithiolethione as a scavenger. *Toxicol. In Vitro*, **13**: 683-688.
- Rekka, E. and Kourounakis, P. N. (1991) Effect of hydroxyethyl-rutinosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**: 486-491.
- Tampo, Y., Tsukamoto, M., and Yonaha, M. (1999) Superoxide production from paraquat evoked by exogenous NADPH in pulmonary endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 588-595.

(2003년 10월 21일 접수)