

장생도라지 (*Platycodon grandiflorum*)의 항산화 활성 평가

김충현, 정봉용, 정선기, 이철호¹, 이현선¹, 김봉희, 김상겸*

충남대학교 약학대학 형질전환 복제돼지 센터
¹한국생명공학연구원, 천연물의약 연구센터

Evaluation of Antioxidant Activity of *Platycodon grandiflorum*

Chung Hyeon Kim, Bong Yong Jung, Sun Ki Jung, Chul Ho Lee¹,
Hyun Sun Lee¹, Bong-Hee Kim and Sang Kyum Kim*

College of Pharmacy and RCTCP, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea
¹Natural Medicine Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT

Platycodon grandiflorum, Doraji as Korean name, is one of the most widely used traditional oriental medicine for bronchial diseases and also used as a folk remedy for geriatric diseases and inflammatory diseases. In recent studies, it has been reported that some effect of *P. grandiflorum* is derived from its antioxidant activity, although there is still a lack of evidence to establish its oxy-radical scavenging activity. In this study, total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) assay was used to evaluate antioxidant activity of total extracts (T-PG), polysaccharide fraction (Po-PG), and saponin fraction (Sa-PG) isolated from *P. grandiflorum* against peroxy radicals and peroxynitrites. And MTT assay was taken to assess cyto-protective effects of T-PG, Po-PG and Sa-PG in H4IIE cells treated with hydrogen peroxide and *tert*-butylhydroperoxide. In the TOSC assay, Sa-PG showed strong oxy-radical scavenging capacity compared with T-PG and Po-PG. In cell-based assay, T-PG and Po-PG protected cells from oxidative stress, but Sa-PG did not protect cells because of cytotoxicity of Sa-PG. These results suggest that the saponin components of *P. grandiflorum* have relatively strong antioxidant capacity and cytotoxicity in rat hepatoma cells.

Key words : *Platycodon grandiflorum*, TOSC assay, cytotoxicity, oxidative stress, antioxidant capacity

서 론

장생도라지는 일반 도라지가 보통 3년에서 5년 간 재배하는 것에 비해 거름기 없는 토지에 옮겨

심기를 주기적으로 반복하여 20년 이상 재배된 것이다. 장생도라지의 유효성분으로 사포닌의 간 보호 효과가 보고되고 있다. 일부 연구에서 장생도라지의 물 추출물 중 사포닌 분획이 농도 의존적으로 *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP)에 의한 rat hepatocytes의 산화적 손상, 활성산소종(reactive oxygen specie; ROS)의 생성과 DNA 손상을 억제하였다. 또한 *in vitro*에서 수행된 연구에서 사포닌에 의한

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-42-821-5930, Fax: +82-42-823-6566
E-mail: sangkim@cnu.ac.kr

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical과 superoxide radical의 포획능이 보고되었다. *In vivo* 실험에서 장생도라지 사포닌 성분을 전처리한 후 t-BHP를 투여하였을 때 혈청 중의 ALT와 AST의 증가를 막았으며, 간에서의 산화적 스트레스를 감소시키는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과는 장생도라지의 사포닌 성분이 oxygen free radical을 제거할 수 있고, 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있다는 것을 시사한다 (Lee *et al.*, 2004).

산화적 스트레스는 신체에서의 활성산소종, 활성 질소종 (reactive nitrogen species; RNS) 등 pro-oxidant의 농도와 신체의 항산화방어체계 사이의 불균형이 일어나 pro-oxidant의 농도가 우세해진 상태를 나타내는 용어이다 (Spector, 2000; Dotan *et al.*, 2004). 산화적 스트레스의 정도에 따라서 세포는 반응하여 회복하거나 손상을 입을 수 있으며 손상이 심할 경우 세포의 사멸을 초래한다 (Spector, 2000). TOSC는 hydroxyl radical, peroxy radical과 peroxynitrite 3종류의 oxy-radical을 사용하며, 반응계에 도입된 시험물질이 oxy-radical에 의한 ethylene gas 생성을 저해하는 정도를 평가한다. 따라서 기본 반응은 oxy-radical과 α -keto- γ -(methylthio)butyric acid (KMBA)가 반응하여 ethylene gas가 발생하는 것이다. TOSC의 주요 이점은 1) 수용성 항산화제와 지용성 항산화제 모두의 scavenging capacity를 측정할 수 있다는 점, 2) 반응 양태에서 fast-acting antioxidant인지, 또는 지연제 (retardant)인지를 구분할 수 있으며, 3) 생물 조직의 항산화 능력 평가에 적용할 수 있다는 점 등이다 (Regoli and Winston, 1999). 그러나 TOSC 방법의 가장 큰 장점은 DPPH와 같이 인공적인 라디칼이 아닌 hydroxyl radical, peroxynitrite 등과 같은 세포에서 실제로 생성되는 생리적산화제에 대한 포획능을 평가할 수 있다는 점이다.

이와 같은 자료들을 토대로 장생도라지의 추출물 중, polysaccharide 분획 (Po-PG)과 사포닌 분획 (Sa-PG), 그리고 장생도라지의 전체 추출물 (T-PG)의 peroxy radical과 peroxynitrite에 대한 포획능을 TOSC assay를 통해서 평가하였다. 또한 랫트간암 세포주인 H4IIE 세포주에 외부에서 산화성물질인 hydrogen peroxide와 t-BHP를 처리하여 산화적 손상을 유발하고 이 모델에서 장생도라지 분획물의 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

사포닌 분획, 다당류 분획, 그리고 전체 추출물들은 한국생명공학연구원에서 제공받았다. 장생도라지 (22년생)는 경상남도 진주시 인근에서 재배된 것으로 장생도라지(주)로부터 공급받았다. *In vitro* 항산화효과를 측정하기 위한 실험에서, glutathione (GSH), N-acetylcysteine (NAC), alpha-keto-gamma-(methylthio)butyric acid (KMBA)와 3-morpholinopyridone hydrochloride (SIN-1)는 Sigma (St. Louis, MO)의 제품을 사용하였으며, potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)와 dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)는 Junsei (Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였고, 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP)와 t-BHP는 Aldrich (St. Louis, MO)의 제품을, Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)는 Fluka (St. Louis, MO)의 제품을 사용하였다. 세포배양을 위한 DMEM과 fetal bovine serum (FBS)은 HyClone (Logan, UC)에서 구입하였으며 항생제는 Gibco (Invitrogen Corporation, CA)의 100 U/mL penicillin과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin을 사용하였다. 이외에 30% hydrogen peroxide (H_2O_2)는 MERCK (Darmstadt, Germany)의 것을 사용하였다.

2. TOSC assay

TOSC assay는 Regoli와 Winston (1999)에 의해 제안된 방법을 사용하여 실시했다. Peroxy radical은 ABAP를 35°C에서 thermal homolysis시켜 발생시켰다 (Winston *et al.*, 1998). Peroxynitrite는 SIN-1의 자발적인 붕괴를 통해 발생시켰다. 발생한 각각의 oxy-radical은 KMBA와 반응하여 ethylene을 발생하며 이때의 TOSC 값은 일정범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고된 바 있다 (Winston *et al.*, 1998). 반응은 1 mL의 반응액을 고무마개로 밀폐된 15 mL 용기에 넣어 진행시켰으며 생성된 ethylene은 반응용기의 head space 공기 0.15 mL을 취하여 GC (GC-2010, Shimadzu, Tokyo, Japan)로 분석하여 검출하였다. Oven, injector와 flame ionization detector의 온도를 각각 60°C,

180°C, 180°C로 설정하고 Supelco SPB-1 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)를 장착한 gas chromatograph 장치를 사용하였다. Carrier gas로는 helium을 사용하였으며 split ratio 30:1로 설정하였다. TOSC 값은 $TOSC=100-(SA/CA \times 100)$ 의 식으로 구했다(Winston *et al.*, 1998). SA는 시간에 따른 sample의 적분 값이고, CA는 시간에 따른 control의 적분 값이다. Control로는 3차 증류수를 사용하였으며 시료로는 도라지 추출물들 외에 양성대조군으로 GSH를 사용하였다. 따라서 oxy-radical scavenging capacity를 전혀 갖지 못하는 시료의 $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며 TOSC=0의 값을 갖는다. 반대로 $\int SA \rightarrow 0$ 일 때는 TOSC 값은 100에 접근한다. Specific TOSC 값은 얻어진 TOSC 값을 시험물질에 농도에 따라 좌표화하고 선형회귀분석(linear regression analysis)을 통해 기울기를 얻은 후 이 값을 시험물질의 농도로 나누어 구하였다. TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

3. Cell-based assay

랫트의 hepatoma cell line인 H4IIE cell을 10% heat-inactivated FBS와 100 units/mL의 penicillin, 100 μg/mL의 streptomycin을 포함하는 DMEM을 배지로 이용하여 온도 37°C와 5% CO₂ 조건에서 배양했다. H4IIE cell을 96 well microplates에 옮기고 18~24시간 배양하여 세포가 80% 이상 confluent에 도달한 후 serum free media로 교체하고 overnight 배양했다. Serum free DMEM 배양액에 실험에 사용할 항산화 물질을 미리 설정한 농도로 녹이고 배양액을 교체한 후 1시간 동안 배양하고 t-BHP 또는 과산화수소를 처리하였다. 예비실험을 통해 t-BHP는 40 μM 그리고 과산화수소는 300 μM을 선정하였다. 이 농도는 H4IIE 세포에서 약 50%의 세포 독성을 유발하였다. t-BHP와 과산화수소를 처리하고 각각 3과 24시간 후에 0.5 mg/mL로 MTT를 녹인 배양액으로 배지를 교체하고 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 배지를 제거하고 DMSO를 처리한 후 micro plate reader (TECAN)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정했다. 양성대조군으로 N-acetylcysteine (NAC)를 사용하였다.

4. 통계 분석

모든 결과는 평균과 표준 편차로 표시하였다. Specific TOSC value를 구하기 위해서 농도변화에 따른 TOSC value의 점 그래프에서 선형회귀분석을 수행하였다. 선형회귀분석에서 얻어진 기울기로부터 specific TOSC value를 계산하였다. 통계적 유의성은 ANOVA test 후 Newman-Keuls multiple comparison test 또는 Dunnett's test를 이용하여 유의성을 확인하였다.

결 과

1. *In vitro* 항산화효과

In vitro 조건에서 oxyradical scavenging capacity를 측정하기 위해 TOSC 법을 적용하였으며, 양성대조군으로 GSH를 사용하였다. 장생도라지의 추출물들을 종류마다 여러 가지의 농도로 설정하여 peroxy radical과 peroxy nitrite에 대한 TOSC assay를 실행하였다. Po-PG, Sa-PG와 T-PG를 사용한 실험에서는 KMBA가 산화되어 발생하는 ethylene gas를 60분간 측정해서, 대조군 60분에서 나오는 최대 ethylene peak height의 값을 기준으로 모든 실험 데이터를 백분율로 환산하여 시간에 따른 ethylene 발생량을 계측하였다. 이 그래프들의 AUC를 가지고 공식을 이용해서 계산한 TOSC value를 농도에 따라 다시 그래프를 도시하여 나온 추세선의 기울기를 구하여 mg/mL당 TOSC value인 specific TOSC value를 산출해서 도표로 도시하여 각 추출물끼리 비교하였다(Table 1, 2).

Peroxy radical에 대한 Po-PG, Sa-PG, T-PG과 GSH의 specific TOSC value는 각각 172.4 ± 49.1 TOSC/mg/mL, 706.7 ± 144.6 TOSC/mg/mL, 144.6 ± 33.1 TOSC/mg/mL과 1233 ± 217 TOSC/mg/mL로 측정되었다. Sa-PG는 Po-PG와 T-PG 모두와 비교할 때, 유의성($P < 0.001$)이 있는 차이를 보이며 보다 높은 peroxy radical 포획능을 나타내었다. Po-PG와 T-PG의 peroxy radical 포획능은 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 1). 장생도라지 추출물은 모두 GSH에 비하여 0.57에서 0.12의 rTOSC 값을 보여 GSH에 비해 미약한 peroxy radical 포획능을 나타내었다.

Table 1. TOSC values of Sa-PG, Po-PG and T-PG against peroxy radicals

Compounds	Concentration (mg/mL)	TOSC value	sTOSC value (TOSC/mg/mL)	rTOSC value
Sa-PG	0.1	46.6	706.7 ± 144.6 ^a (R ² =0.980)	0.57
	0.05	36.3		
	0.025	21.8		
	0.0125	13.1		
Po-PG	0.1	15.7	172.4 ± 49.1 ^b (R ² =0.954)	0.14
	0.05	9.9		
	0.025	3.2		
	0.0125	-0.5		
T-PG	0.1	13.6	144.6 ± 33.1 ^b (R ² =0.970)	0.12
	0.05	6.8		
	0.025	3.7		
	0.0125	-0.6		

The sTOSC values were obtained from the slope of the linear regression lines for the TOSC curves, and the rTOSC values were determined by dividing the sTOSC value of the sample by that of GSH. The specific TOSC values of GSH against peroxy radicals were 1233 ± 217 TOSC/mg/mL. Values with different superscripts (a, b) are significantly different from each other (ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, P < 0.001).

Table 2. TOSC values of Sa-PG, Po-PG and T-PG against peroxynitrite

Compounds	Concentration (mg/mL)	TOSC value	sTOSC value (TOSC/mg/mL)	rTOSC value
Sa-PG	0.05	34.6	982.4 ± 69.1 ^a (R ² =0.998)	2.8
	0.025	24.2		
	0.0125	11.8		
	0.00625	4.9		
Po-PG	0.1	4.8	51.6 ± 21.5 ^b (R ² =0.906)	0.1
	0.05	1.0		
	0.025	0.0		
	0.0125	-0.4		
T-PG	0.05	17.2	348.0 ± 24.1 ^c (R ² =0.998)	1.0
	0.025	7.9		
	0.0125	3.5		
	0.00625	1.7		

The sTOSC values were obtained from the slope of the linear regression lines for the TOSC curves, and the rTOSC values were determined by dividing the sTOSC value of the sample by that of GSH. The specific TOSC values of GSH against peroxynitrite were 352 ± 42 TOSC/mg/mL. Values with different superscripts (a, b, c) are significantly different from each other (ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, P < 0.001).

Peroxynitrite에 대한 Po-PG, Sa-PG, T-PG과 GSH의 specific TOSC value는 각각 51.6 ± 21.5 TOSC/mg/mL, 982.4 ± 69.1 TOSC/mg/mL, 348.0 ± 24.1 TOSC/mg/mL과 352 ± 42 TOSC/mg/mL로 측정되었다. Sa-PG는 Po-PG와 T-PG 모두와 비교할 때, 유의성(모두 P < 0.001)이 있는 차이를 보이며 보다 월등하게 높은 활성을 보였다. 또한 peroxy radical의 결과와 다르게, T-PG가 Po-PG에 비해 유의성(P < 0.001)이 있는 큰 차이를 보이며 큰 값을 나타

냈다(Table 2). 양성대조군인 GSH와 비하여 T-PG는 동등한 peroxynitrite 포획능을 Sa-PG는 2.8배의 포획능을 그리고 Po-PG는 약 10%의 포획능을 보였다.

2. 세포보호효과

장생도라지의 추출물인 Po-PG, Sa-PG와 T-PG의 산화적 스트레스에 의한 세포독성 억제효과를 측정

하고자, 랫트의 간암 세포인 H4IIE 세포를 사용해서 MTT assay를 실행하였다. 산화적 스트레스를 유발하기 위해서 hydrogen peroxide와 유기 과산화물인 t-BHP를 사용하였다. 선행 연구결과를 바탕으로 세포에 적용하기 위한 hydrogen peroxide와 t-BHP의 농도와 시간은 각각 0.3 mM과 24시간 그리고 40 µM과 3시간으로 설정하였다.

먼저 Sa-PG, Po-PG와 T-PG의 세포독성을 알아보기 위해서, hydrogen peroxide와 t-BHP의 처리 없이 Sa-PG, Po-PG와 T-PG 각각을 단독으로 H4IIE 세포에 24시간 동안 처리하였다. 24시간 동안 Sa-PG, Po-PG와 T-PG를 처리한 결과에서 H4IIE 세포의 생존율은 대조군을 100.0±7.3%로 할 경우, Po-PG는 100 µg/mL에서 102.7±5.2% (P>0.05)의 결과가 나왔고, T-PG는 100 µg/mL에서 106.6±5.5% (P>0.05)의 결과가 나와서 두 물질의 경우 유의성이 있는 세포독성을 나타내지 않았으나, Sa-PG의 경우 세포 생존율이 1 µg/mL에서 100.8±5.9% (P>0.05), 5 µg/mL에서 102.0±4.5% (P>0.05), 10 µg/mL에서 91.8±6.1% (P<0.01), 25 µg/mL에서 65.7±3.8% (P<0.001), 50 µg/mL에서 56.1±3.9% (P<0.001), 100 µg/mL에서 32.0±4.1% (P<0.001)의 결과를 나타내어 10 µg/mL 이상에서는 유의성이 있는 세포독성을 나타내었다(Fig. 1). 또한 이들 물질을 3시간 동안 처리하고 독성을 관찰한 결과 Sa-PG는 5 µg/mL부터 농도의존적으로 유의적인 세포독성을 보였으며 반면 Po-PG와 T-PG는 10 µg/mL까지 세포생존율에 변화를 유발하지 않았다(data not shown).

Sa-PG, Po-PG와 T-PG의 세포독성을 알아본 후, 각 물질의 최대 처리 농도를 설정하고, hydrogen peroxide와 t-BHP에 의한 세포독성에 대한 Sa-PG, Po-PG와 T-PG, 그리고 양성대조군으로서 NAC의 세포보호효과를 측정하였다. 먼저, t-BHP에 의한 세포독성에 대한 세포보호효과를 측정하기 위해서, H4IIE 세포에 여러 농도의 Sa-PG, Po-PG, T-PG, 그리고 NAC을 각각 1시간 동안 전처리한 다음, 40 µM의 t-BHP를 처리하여 3시간 후에 생존율을 측정하였다. Sa-PG의 경우, 대조군이 100.0±4.1%일 때, 40 µM t-BHP만 처리한 군에서 82.7±4.2%의 세포 생존율이 관찰되었으며, 0.1 µg/mL에서 80.6±4.1% (P>0.05), 0.5 µg/mL에서 80.5±4.4% (P>0.05), 1 µg/mL에서 80.7±7.0% (P>0.05), 5 µg/mL

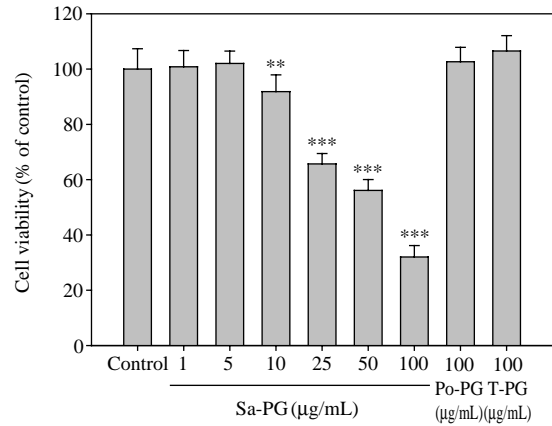


Fig. 1. Cell viability in H4IIE cells treated with Sa-PG, Po-PG, and T-PG for 24 hrs. Control cells were treated with the same volume of phosphate buffered saline. The percentage of cell viability was calculated from the absorbance data. Data are means ± SD for eight independent measurements. **, ***Significantly different from levels monitored in control cells, P<0.01, or P<0.001, respectively (ANOVA followed by the Dunnett's range test).

에서 82.0±4.5% (P>0.05), 10 µg/mL에서 81.1±2.9% (P>0.05), 25 µg/mL에서 66.6±1.5% (P<0.001)의 세포 생존율을 나타냈다(Fig. 2). Po-PG의 경우, 대조군이 100.0±5.8%일 때, 40 µM t-BHP만 처리한 군에서 59.5±12.8%의 세포 생존율을 보였으며, 0.1 µg/mL에서 71.3±9.1% (P<0.05), 0.5 µg/mL에서 84.5±9.9% (P<0.001), 1 µg/mL에서 86.1±13.0% (P<0.001), 5 µg/mL에서 84.4±11.5% (P<0.001), 10 µg/mL에서 89.5±10.5% (P<0.001)의 세포 생존율을 나타냈다(Fig. 2). T-PG의 경우, 대조군이 100.0±5.8%일 때, 40 µM t-BHP만 처리한 군에서 59.5±12.8%의 세포 생존율이 관찰되었고, 0.1 µg/mL에서 85.2±10.6% (P<0.001), 0.5 µg/mL에서 81.9±7.7% (P<0.001), 1 µg/mL에서 90.3±8.4% (P<0.001), 5 µg/mL에서 89.5±8.3% (P<0.001), 10 µg/mL에서 104.6±6.1% (P<0.001)의 세포 생존율을 나타냈다(Fig. 2). 양성대조군인 NAC의 경우, 대조군이 100±9.2일 때, 40 µM t-BHP만 처리한 군에서는 56.8±7.1의 세포생존율이 관찰되었고, 13 µg/mL에서 62.5±9.7%, 40 µg/mL에서 66.5±9.3%, 120 µg/mL에서 79.1±7.9%,

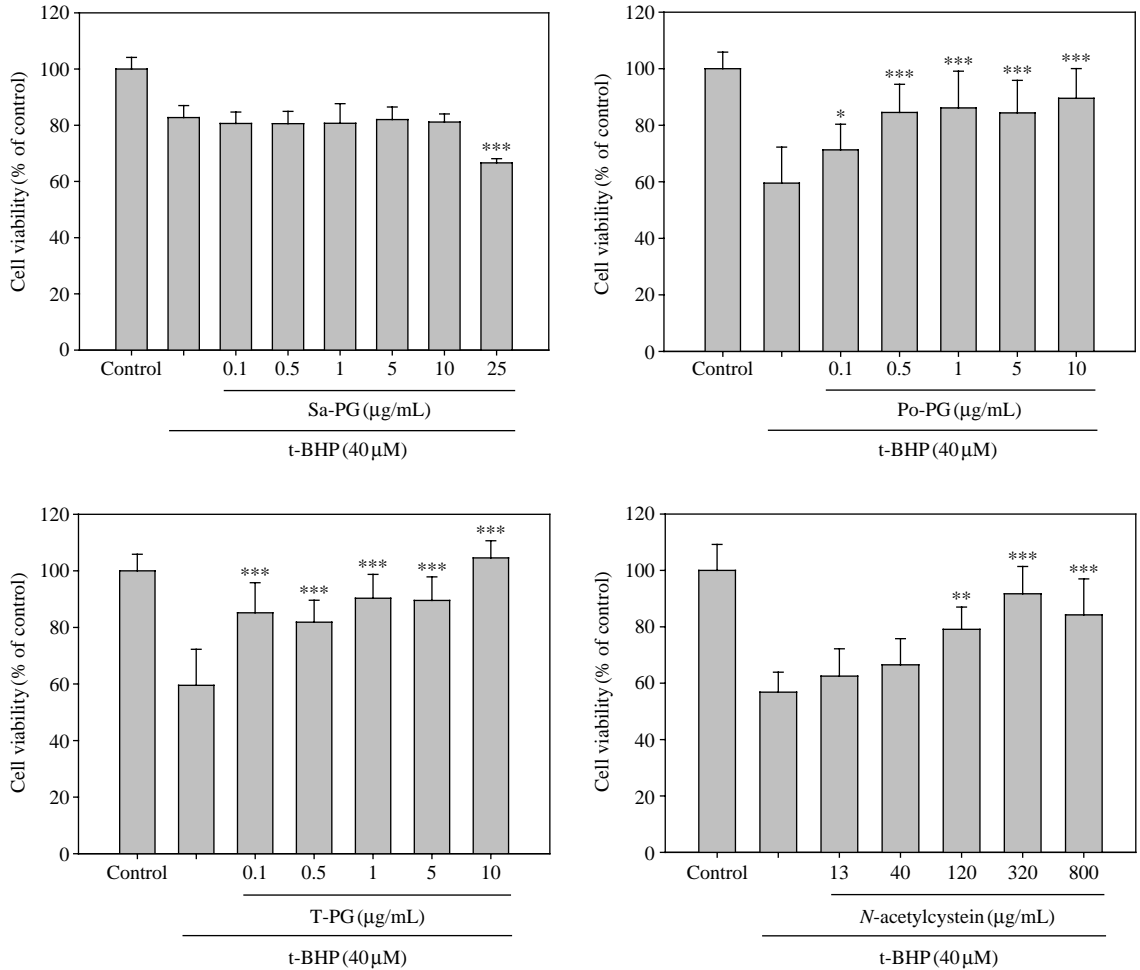


Fig. 2. Effects of Sa-PG (A), Po-PG (B), T-PG (C) and *N*-acetylcysteine (D) on cytotoxicity induced by t-BHP in H4IIE cells. Cells were treated with Sa-PG (0~25 µg/mL), Po-PG (0~10 µg/mL), T-PG (0~10 µg/mL) or *N*-acetylcysteine (0~800 µg/mL) for 1 hr before addition of 40 µM t-BHP for 3 hrs. The percentage of cell viability was calculated from the absorbance data. Data are means ±SD for eight independent measurements. *, **, ***Significantly different from levels monitored in cells treated with H₂O₂ only, control cells, P<0.05, P<0.01 or P<0.001, respectively (ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test).

320 µg/mL에서 91.7±9.7%, 800 µg/mL에서 84.2±12.8%의 세포생존율이 관찰되었다(Fig. 2).

Hydrogen peroxide에 의한 세포독성에 대한 세포보호효과를 측정하기 위해서, H4IIE 세포에 여러 농도의 Sa-PG, Po-PG, T-PG를 각각 1시간 동안 전처리한 다음, 0.3 mM의 hydrogen peroxide를 처리하여 24시간 후에 생존율을 측정하였다. Sa-PG의 경우, 대조군이 100.0±10.1%일 때, 0.3 mM hydro-

gen peroxide만 처리한 군에서 20.9±2.7%의 세포 생존율이 관찰되었고, 0.1 µg/mL에서 25.8±5.9% (P>0.05), 0.5 µg/mL에서 30.1±5.3% (P<0.05), 1 µg/mL에서 27.8±3.7% (P>0.05), 5 µg/mL에서 26.7±4.4% (P>0.05), 10 µg/mL에서 25.0±4.5% (P>0.05)의 세포생존율을 나타냈다(Fig. 3). Po-PG의 경우, 대조군이 100.0±11.1%일 때, 0.3 mM hydrogen peroxide만 처리한 군에서 33.0±7.5%의

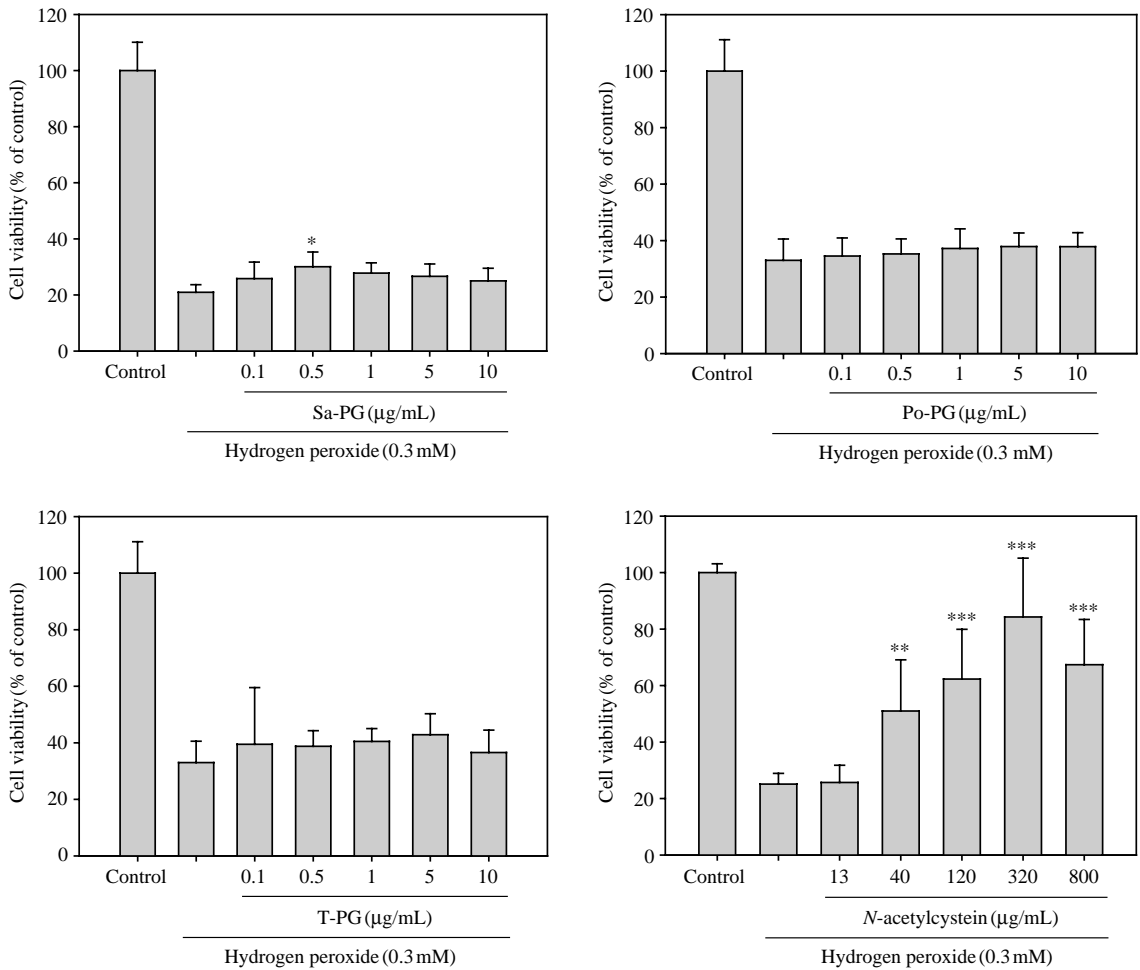


Fig. 3. Effects of Sa-PG (A), Po-PG (B), T-PG (C) and *N*-acetylcysteine (D) on cytotoxicity induced by H₂O₂ in H4IIE cells. Cells were treated with Sa-PG (0~25 µg/mL), Po-PG (0~10 µg/mL), T-PG (0~10 µg/mL) or *N*-acetylcysteine (0~800 µg/mL) for 1 hr before addition of 0.3 mM hydrogen peroxide for 24 hrs. The percentage of cell viability was calculated from the absorbance data. Data are means±SD for eight independent measurements. *, **, ***Significantly different from levels monitored in cells treated with H₂O₂ only, control cells, P<0.05, P<0.01 or P<0.01, respectively (ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test).

세포 생존율이 관찰되었고, 0.1 µg/mL에서 34.5 ± 6.4% (P>0.05), 0.5 µg/mL에서 35.3 ± 5.3% (P>0.05), 1 µg/mL에서 37.2 ± 7.0% (P>0.05), 5 µg/mL에서 37.9 ± 4.8% (P>0.05), 10 µg/mL에서 37.8 ± 5.0% (P>0.05)의 세포생존율을 나타냈다(Fig. 3). T-PG의 경우, 대조군이 100.0 ± 11.1%일 때, 0.3 mM hydrogen peroxide만 처리한 군에서 33.0 ± 7.5%의 세포 생존율이 나왔고, 0.1 µg/mL에서 39.5 ± 20.0%

(P>0.05), 0.5 µg/mL에서 38.8 ± 5.5% (P>0.05), 1 µg/mL에서 40.5 ± 4.6% (P>0.05), 5 µg/mL에서 42.9 ± 7.4% (P>0.05), 10 µg/mL에서 36.6 ± 7.9% (P>0.05)의 세포생존율을 나타냈다(Fig. 3). 양성 대조군인 *N*-acetylcystein의 경우, 대조군이 100 ± 3.1일 때, 0.3 mM hydrogen peroxide만 처리한 군에서는 25.1 ± 3.8의 세포생존율이 관찰되었고, 13 µg/mL에서 25.7 ± 6.1%, 40 µg/mL에서 51.0 ± 18.1

%, 120 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $62.3 \pm 17.6\%$, 320 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $84.3 \pm 20.8\%$, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $67.4 \pm 16.0\%$ 의 세포 생존율이 관찰되었다(Fig. 3). 종합적으로 t-BHP에 의해 유도된 세포독성에서 Po-PG와 T-PG가 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 유의성 있는 세포보호효과를 나타냈다. 반면 hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포독성에서 Po-PG와 T-PG는 유의성 있는 세포보호효과를 나타내지 못 하였다. H4IIE cell에서 Sa-PG는 Po-PG나 T-PG보다 독성이 강하여 5 또는 10 $\mu\text{g/mL}$ 부터 독성을 나타내었으며 이로 인하여 t-BHP 실험에서 Sa-PG가 25 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 처리될 경우 독성이 증가하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포독성에서 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 Sa-PG는 미약한 세포보호효과를 보였으나 이 효과는 Sa-PG의 농도에 의존적이지 않았다.

고 찰

전통적으로 민간요법으로 사용되어온 식물들이 간 질환을 포함한 여러 질병을 치료하는 효과가 최근 여러 학자들에 의해 보고되고 있다(Luper, 1998). 본 연구에서는 최근 재배법이 개발된 장생도라지의 추출물을 이용하여 TOSC assay를 통해 *in vitro*에서의 항산화효과를 측정하고, 랫트의 간암 세포인 H4IIE 세포에서 MTT assay를 통해 산화적 스트레스를 유발하는 독성물질에 대한 세포보호효과를 실험하였다.

TOSC assay에서 사용되는 radical에는 hydroxyl radical, peroxy radical, peroxynitrite 3종류가 있으나(Regoli and Winston, 1999), 본 연구에서는 peroxy radical과 peroxynitrite를 사용하였다. Peroxy radical은 지질산화연쇄반응(lipid oxidation chain reaction)에 의해 형성된다. Peroxy radical은 식품에서 발견하기 쉽고, 식품의 질을 떨어뜨린다(Magalhães *et al.*, 2008). Peroxynitrite는 superoxide와 NO가 반응하여 생성되며, hydrogen peroxide의 Fenton reaction보다 효과적으로 hydroxyl radical을 생성한다. 또한 peroxynitrite는 nitrogen dioxide를 생성하여 산화반응을 일으킬 수도 있다. Peroxynitrite는 스스로도 강한 산화제로 작용하며, 전자가 많은 잔기에 직접 반응한다. 또한 강한 산화력을 가지고 있음에도 불구하고, peroxynitrite는 안정한 화합물

이다. Peroxynitrite는 또한 음이온으로서 electrophile과도 반응하는데, 대표적으로 carbon dioxide와 반응하여, carbonate radical을 생성함으로써, 산화적 스트레스를 야기한다(Pacher *et al.*, 2007).

TOSC assay는 *in vitro*에서 peroxy radical과 peroxynitrite에 대한 Po-PG, Sa-PG와 T-PG의 정량적인 항산화효과를 평가하였다. Peroxy radical을 사용한 TOSC assay 결과에서 Sa-PG의 specific TOSC value는 Po-PG와 T-PG보다 훨씬 큰 값을 나타냈으며, 양성대조군으로 사용한 GSH의 약 0.57배의 값을 나타냈다. 반면에, Po-PG와 T-PG의 specific TOSC value는 각각 GSH의 약 0.14배, 약 0.12배를 나타냈다. Peroxynitrite를 사용한 TOSC assay 결과에서는 Sa-PG의 specific TOSC value가 Po-PG와 T-PG보다 훨씬 큰 값을 나타냈으며, 양성대조군으로 사용한 GSH의 약 2.8배의 값을 나타냈다. T-PG의 specific TOSC value는 GSH의 약 1.0배를 나타냈고, Po-PG의 specific TOSC value는 GSH의 약 0.1배를 나타냈다. 이를 통해서 도라지의 추출물 분획 중 사포닌 분획이 *in vitro*에서 항산화효과가 큰 것을 알 수 있었다.

세포에서의 산화적 스트레스에 대한 장생도라지의 세포보호효과를 알아보기 위해서 hydrogen peroxide와 t-BHP를 사용한 MTT assay를 실행하였다. Hydrogen peroxide는 *in vivo*에서 peroxisome이나 glucose oxidase, amino acid oxidase 같은 여러 산화효소들, 또는 superoxide dismutase에 의한 superoxide radical의 dismutation에 의해서 생성된다(Magalhães *et al.*, 2008). Hydrogen peroxide는 세포 안팎으로 쉽게 확산되며 따라서 다른 ROS와는 달리 핵 내부에서 구리와 같은 전이금속 이온에 의해서 hydroxyl radical을 생성하여 DNA를 손상시키기도 한다(Halliwell, 1996; Collins, 1999). 또한 hydrogen peroxide가 mitochondria에 작용하여 membrane potential을 혼란시키면 cytochrome c가 방출된다. 방출된 cytochrome c는 apoptotic protease activating factor-1에 결합하고 caspase-9과 caspase-3를 단계적으로 활성화시켜서 세포사(apoptosis)를 일으킨다(Chandra *et al.*, 2000). t-BHP는 간의 cytochrome P450과 적혈구의 hemoglobin에 의해 대사되어 free radical을 생성하며, 지질 과산화를 일으키고, 세포 형태를 변화시키며, 세포내 분자들과 공유결합을 형성한다. 또한 t-BHP는 glutathione peroxi-

dase에 의해 빠른 속도로 *tert*-butyl alcohol과 glutathione disulfide를 생성하며 NADPH를 산화시킨다. GSH와 NADPH가 고갈되어 칼슘 이온의 항상성 유지가 불가능해지며 원형질막에 수포가 생성된다(Rush *et al.*, 1985). 세포배양실험계에서 t-BHP는 간세포에서 lactate dehydrogenase와 alanine amino-transferase를 누출시키고, malondialdehyde를 형성하며 GSH의 고갈을 유발한다(Lin *et al.*, 2000).

MTT assay를 이용하여 t-BHP 또는 hydrogen peroxide에 의해 유발된 산화적 손상 모델에서 Po-PG, Sa-PG와 T-PG의 세포보호효과를 평가하였다. t-BHP에 의해 유도된 세포독성에서 Po-PG와 T-PG가 유의성 있는 세포보호효과를 나타내었으나 hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포독성에서 동일한 효과가 관찰되지 않았다. Sa-PG는 t-BHP와 hydrogen peroxide의 독성에 미약한 효과를 보였다.

장생도라지 추출물을 이용한 *in vitro* TOSC 결과와 t-BHP에 의해 유도된 산화적 손상에서 세포보호 효과는 차이를 보였다. Sa-PG의 경우에는 radical을 scavenging하는 효과는 컸지만, t-BHP나 hydrogen peroxide을 처리하여 유발시킨 산화적 손상 모델에서 랫트 간암세포인 H4IIE 세포를 보호하지 못 하였다. 이 결과는 *in vitro* 실험과 달리 세포 배양계에서는 다양한 요인이 산화적 스트레스 및 항산화활성에 작용함을 시사한다. 또한 간암세포에서의 세포독성 효과는 추후 장생도라지의 사포닌 분획이 항암 또는 항암보조제로 사용될 수 있음을 시사한다. Po-PG와 T-PG의 경우에는, 직접적인 항산화효과는 크지 않지만 효과적으로 t-BHP의 독성을 억제하였다. 본 연구에서 기전을 규명하기 위한 실험은 수행되지 않았으나 Po-PG와 T-PG의 성분 중 일부가 직접적인 oxy-radical 포획능은 낮으나 다른 기전을 통해 산화적 손상을 억제할 가능성이 있는 것으로 보인다. 가능한 기전으로는 1) glucose 대사 과정 중의 하나인 hexose monophosphate shunt을 통한 NADPH의 공급 증가(Gupte, 2008), 2) 항산화효소의 발현 또는 활성 증가(Nguyen *et al.*, 2009), 3) 세포 사멸과정을 매개하는 세포신호전달체계의 억제 또는 세포생존과 관련된 세포신호전달체계의 활성화(Raju and Mehta, 2009) 등이 가능할 것이다. 이후 연구는 Po-PG와 T-PG에서 단일 성분을 분리하여 간접적인 경로를 통한 세포보호효과에 대한

추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업(과제 번호: 20070501-034-004-007-01-01)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

- Chandra J, Samali A and Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3-4): 323-333.
- Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer, *Bioessays* 1999; 21(3): 238-246.
- Dotan Y, Lichtenberg D and Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress, *Prog Lipid Res* 2004; 43(3): 200-227.
- Gupte SA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases, *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9(9): 993-1000.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease, *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 33-50.
- Lee KJ, Choi CY, Chung YC, Kim YS, Ryu SY, Roh SH and Jeong HG. Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity, *Toxicol Lett* 2004; 147(3): 271-282.
- Lin WL, Wang CJ, Tsai YY, Liu CL, Hwang JM and Tseng TH. Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by *t*-butyl hydroperoxide in rat liver, *Arch Toxicol* 2000; 74(8): 467-472.
- Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1, *Altern Med Rev* 1998; 3(6): 410-421.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S and Lima JL. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, *Anal Chim Acta* 2008; 613(1): 1-19.
- Nguyen T, Nioi P and Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress, *J Biol Chem* 2009; 284(20): 13291-13295.
- Pacher P, Beckman JS and Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev* 2007; 87(1): 315-424.
- Raju J and Mehta R. Cancer chemopreventive and therapeutic

- effects of diosgenin, a food saponin, *Nutr Cancer* 2009; 61(1): 27-35.
- Regoli F and Winston GW. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxyne, peroxy radicals, and hydroxyl radicals, *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 156(2): 96-105.
- Rush GF, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski P and Hewitt WR. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes, *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 78(3): 473-483.
- Spector A. Review: Oxidative stress and disease, *J Ocul Pharmacol Ther* 2000; 16(2): 193-201.
- Winston GW, Regoli F, Dugas AJ Jr, Fong JH and Blanchard KA. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, *Free Radic Biol Med* 1998; 24(3): 480-493.