

Regulation of Quinone Reductase Activity in Mice by Dehydroglyasperin C Isolated from Licorice

Jung-Hwa Han, Jong-Sang Kim*

School of Applied Bioscience and Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

감초에서 분리된 데하드로글라이아스페린 C에 의한 마우스 모델계에서 quinone reductase 활성의 조절

한정화, 김정상*

경북대학교 응용생명과학부 및 식품공학부

Abstract

Licorice, *Glycyrrhizae radix*, is one of the oldest and most frequently used botanicals in the oriental medicine. Our previous study showed that dehydroglyasperin C (DGC) isolated from licorice had antioxidant activity and induced phase 2 detoxifying enzymes in mouse hepatoma cells. Therefore, this study was conducted to investigate the effect of exposure time to DGC on quinone reductase (QR), one of the anticarcinogenic biomarkers, and antioxidant potential of plasma using animal model. ICR mice were divided into 7 groups, in which mice in each group were injected with DGC (5 mg/kg b.w.) for 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 hours respectively. Following the treatment the organs including liver, kidney, lung, stomach, large intestine, small and large intestines were collected and subjected to QR activity assay, western blotting, and FRAP assay. Exposure to DGC caused a significant induction of QR activity in stomach and large intestine of mice. Ferric reducing activity of plasma, a typical biomarker for antioxidative potential showed that DGC improved antioxidant potential in mice. However, no significant effect of DGC was observed in the other organs.

Keywords : licorice, Dehydroglyasperin C, Antioxidant activity, Quinone reductase

서론

감초는 세계에서 가장 오래 전부터 사용된 약용식물의 하나이며, 콩과의 *Glycyrrhiza* 속의 다년생 초본식물로서 (Wang, 2001), 예로부터 진통·진경·진해·거담 등의 목적으로 사용되어 왔으며, 소화성 궤양, 습진, 피부 감염, 입술의 발진, 갱년기 장애, 간질환, 호흡기질환, 염증성질환, 만성 피로 증후군, 후천성 면역 결핍증 (AIDS), 심지어는 암까지 치료할 수 있는 약용식물로 알려져 있다. 그 중에도 감초의 glycyrrhizin과 chalcones 성분은 항산화제의 기능을 하고, 면역 시스템을 자극하며, 발암물질과 같은 DNA 부산물의 생성을 억제하며, 암의 발달과 연관이 있는 대사성 경로를 억제하며 (Wang, 2001), 1상 또는 2상 해독효소계를 유도하는 것으로 밝혀졌다 (Shibata et al. 2000; Thimmulappa et al. 2008).

선행연구에서는 감초에서 분리된 dehydroglyasperin C (DGC)는 간암세포 모델계에서 다른 물질보다 비교적 높은 항산화 능력과 2상 해독효소계의 활성을 유도함을 알 수 있었다 (Seo et al. 2010). 반면 동물 모델계에서 DGC를 5 mg/kg b.w. 농도로 근육 주사하여 항산화효소계에 미치는 영향을 평가하였을 때, 음성대조군과 비교하여 신장 외 다른 장기에서는 유의적 활성증가를 보이지 않았다 (Seo et al. 2009). 그리하여 본 연구에서는 동일한 수준의 DGC를 투여하고 항산화효소가운데 대표적인 quinone reductase 효소 활성의 경시적인 변화가 관찰되는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

Received: February 7, 2013 / Revised: March 27, 2013 / Accept: March 28, 2013

*Corresponding Author: Jong-Sang Kim, Tel. 82-53-950-5752, Fax. 82-53-950-6750, Email. vision@knu.ac.kr

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0009782)

©2012 College of Agricultural and Life Science, Kyungpook National University

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, Provided the Original work is Properly cited.

실험 재료

실험에 사용된 시약과 용액은 ACS 등급 또는 그 이상의 등급이었다. 대부분의 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용했으며, 용매는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 모든 과정에서 사용된 물은 저항이 18.2 MΩ인 Milli-Q 정화 시스템 (Bedford, MA, USA)을 이용하였다.

실험 동물

체중이 30~32g인 6주령 ICR계 수컷 흰쥐를 대한 바이오링크 (Daejeon, Koera)에서 분양 받았으며 1주일간 물과 일반 식이를 자유 급여하여 안정화시켰다.

실험시료의 제조

Dehydroglyasperin C (DGC)는 n-hexane/EtOH (9:1, volume)을 용매로 한 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*)의 추출물에서 분리 동정한 것으로(Figure 1)(4), 5%의 EtOH, 5% Tween 20, 90% phosphate buffered saline (PBS) 순으로 용해한 것을 사용하였다.

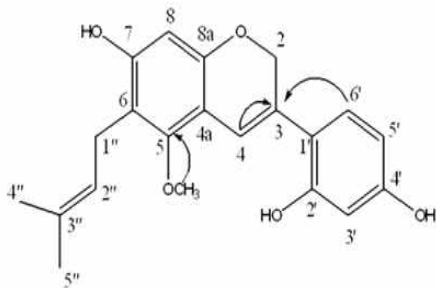


Figure 1. Structure of dehydroglyasperin C.

동물 실험

ICR mouse 14 마리를 무작위로 7개 군으로 나누었다. 각 군 별로 DGC 처리 시간에 차이를 두어 각각 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 시간 동안 DGC를 5 mg/kg b.w. 이 되도록 복강주사 하였다 (Figure 2).

채혈 및 장기수집

해부 12시간 전에 절식한 후, diethyl ether를 사용하여 마취를 시킨 다음 희생시켰다. 혈액은 안와 정맥에서 채혈하였으며, 개복한 뒤 간, 신장, 폐, 위, 대장, 소장 등의 장기를 채취한 다음, 차가운 식염수에 세척한 후 분석에 사용하였다. 위, 폐, 간, 신장은 각 장기를 0.1 g씩 동일한 부분을 잘라서 PBS를 400 μL 넣어 ultrasonic cell disrupter (50W, Kontes, Vineland, NJ, USA)를 이용하여 파쇄하고, 12,000 rpm, 4°C, 1시간 동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 대장과 소장은 scraper로 점막을 수집한 후 PBS를 400 μL 넣어, 12,000 rpm, 4°C에서 1시간 동안 원심분리하여 상등

액을 취하였다. 각 장기별로 위 과정을 3번 반복하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였으며, 시료는 -70 °C에 보관하였다. 수집한 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장을 분리하였고, 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

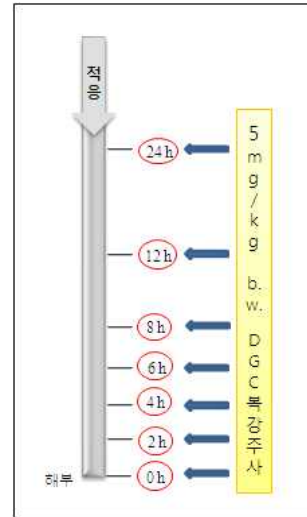


Figure 2. Experimental design.

Quinone reductase (QR) 효소 활성 평가

세포질의 QR 효소 활성은 Benson 등의 방법 (1980)을 다소 변형시켜 측정했으며, 이는 QR 효소 활성에 의해 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) 의 단위 시간당 600 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 효소 활성을 환산하였다. QR 효소활성은 1분간 감소 되는 흡광도와 DCPIP의 molar extinction coefficient ($2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)로부터 환원된 DCPIP의 양을 계산하고, 효소 활성 측정에 사용한 시료의 단백질 함량은 Lowry법 (Peterson et al. 1977 Bradford 1976)을 이용하여 측정하여 nmols DCPIP reduced/min/mg protein 으로 나타내었다. 각 장기별로 유사한 단백질량을 맞춰주기 위해 Bradford법 (Bradford et al. 1976; Peterson et al. 1977)을 이용하여 단백질량을 측정하였으며, 단백질량은 PBS로 희석하여 맞춰주었다. Working solution 2.8 mL (250 mM Tris-HCl pH 7.4, 70 mg bovine serum albumin, 0.1 % Tween 20, 0.5 mM FAD, 2 mM NADH)에 장기 추출액 0.2 mL를 잘 섞은 다음, 이 중 2.7 mL를 취하여 기질 (0.4 mM DCPIP)이 들어있는 cuvette에 넣어서 600 nm에서 1분 동안의 변화량을 측정하였다.

단백질 분리, 전기영동 및 Western blot

간과 '위의 추출액의 단백질을 Bradford법으로 정량하여 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 PVDF

membrane (Milipore Co, USA)으로 electroblot에 의해 transfer 시킨 후, 3% BSA를 함유한 TBS-T (0.1 % Tween 20 in TBS)에 2시간 동안 비특이적 단백질을 blocking시킨 다음, 특정 단백질 (NQO1)에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 4°C에서 하룻밤 동안 항원 항체반응을 일으킨 후 TBS-T로 씻어내고 특정항체에 대한 이차 항체반응을 실시하였다. 형광 감광용액 (Super signal west pico-chemiluminescent substrate, Thermo Scientific, USA)에 적용시킨 다음 LAS-4000 mini (Fuji film, Japan)를 사용하여 NQO1의 단백질 발현 양상을 확인하였다.

혈장 내 FRAP 분석

Ferric reducing ability of plasma (FRAP) 분석은 ferric tripyridyltriazin (FeIII-TPTZ) complex가 ferrous (FeII-TPTZ) form으로 환원되면서 593 nm에서 푸른색 흡광도를 나타내는 원리를 이용한 것이다 (Benzie et al. 1996). 96-well plate에

170 μ l distilled water, 7 μ l의 농도별 표준 용액 (0.1~1.0 mM, FeSO₄ 7H₂O), 30 μ l의 FRAP reagent (200 mL acetate buffer, 20 mL TPTZ solution, 20 mL FeCl₃ solution, 24 mL distilled water)를 넣고 섞어준 후 실온에서 4분 동안 반응시켰다. 이후에 microplate reader로 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 항산화제로 잘 알려진 ascorbic acid, α -tocopherol, butylated hydroxytoluene (BHT), trolox를 사용하였다.

통계학적 분석

Data의 통계학적 분석은 SPSS software (SPSS, Inc., Chicago, IL)에 의한 분산분석 (ANOVA)을 통해 검증하였으며 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다. ($p < 0.05$)

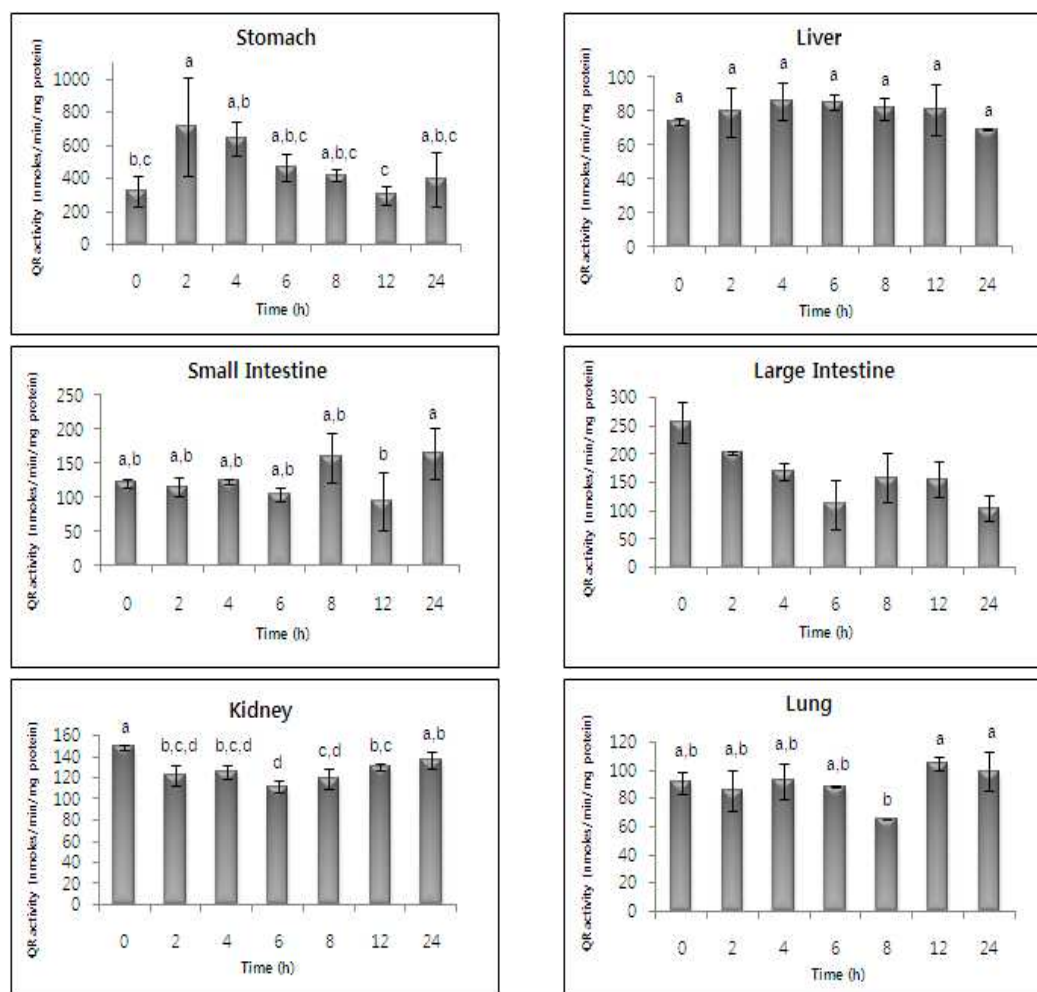


Figure 3. Change of QR enzyme activity in tissues from mice treated with DGC.

결과 및 고찰

시간별 DGC 처리에 따른 장기별 QR 유도 활성
 이전의 연구에서 나타난 세포 수준에서의 2상 효소계의 유도효과를 보인 DGC가 48시간 동안 DGC(5 mg/kg b.w.)를 처리한 동물실험에서는 유의적인 결과를 크게 보이지 않았다. 이에 DGC 처리 시간의 차이가 각 장기 (간, 신장, 폐, 위, 대장, 소장)의 QR 유도 활성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간 별로 DGC를 처리하여 각 장기별 QR 유도 활성을 측정하였다. 실험을 수행한 결과, 장기마다 QR 유도 활성이 차이가 있었다 (Figure 3). 위에서는 다른 장기에 비해 QR 활성이 매우 높은 편이었으며, DGC 처리 2시간 후 QR 유도활성이 증가하였고 4시간 이후로부터 다시 활성이 감소하기 시작하여 12시간, 24시간 후에는 대조군과 유사한 수준까지 회복되었다 (Figure 3).

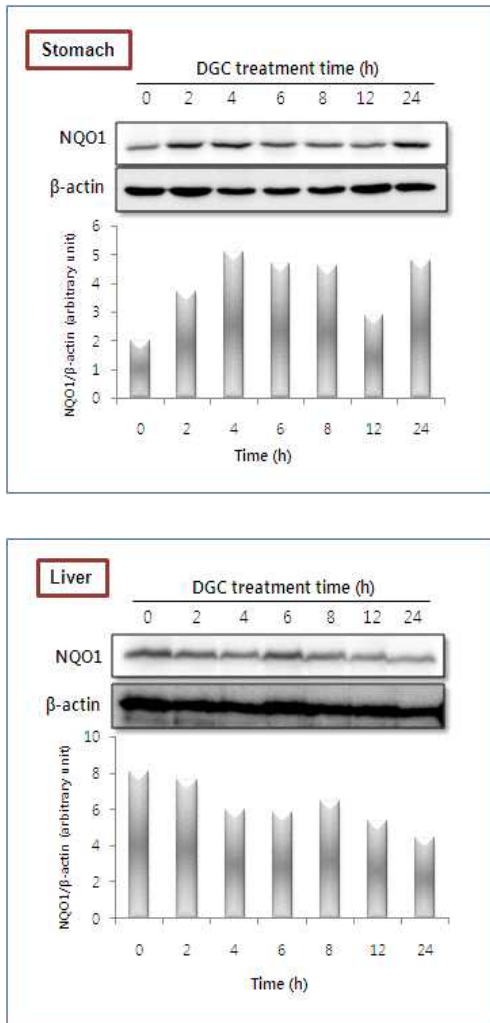


Figure 4. Effect of DGC on the expression of NQO1 enzyme

in liver and stomach of mice.

이는 DGC가 위에 가장 잘 작용하며, DGC가 항산화 및 해독 효소계의 지표인 quinone reductase를 유도하였으나, 점차 자체 방어시스템의 작용으로 인해 QR 활성이 감소한 것으로 추정된다. 한편 높은 농도로 처리하여 독성이 발현 되었을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 이에 비해 간에서는 시간별 처리에 따른 유의적인 변화가 보이지 않았는데, 이는 세포의 대사작용이 가장 활발하여 DGC가 빠르게 대사되어 제거되므로 QR 활성이 나타나지 않은 것으로 추측된다. 또한 대장과 같은 경우에는 대조군에 비해 DGC 처리 시간이 길수록 QR 활성이 감소하는 경향을 보였으며, 나머지 소장, 신장, 폐와 같은 경우에는 크게 유의적인 차이를 보이지 않았다.

시간별 DGC 처리에 따른 NQO1 발현변화

시간별 DGC 처리에 따른 항산화/2상 해독효소의 지표 효소인 QR의 단백질 발현 패턴을 확인하기 위하여 간과 신장의 균질액에 대해서 western blot을 수행한 결과, 간에서는 QR 유도 활성과 마찬가지로 처리 시간에 따라 유의적인 변화가 크게 일어나지 않았으며 (Figure 4), 이는 역시 간의 활발한 대사작용 때문인 것으로 사료된다. 또한 위의 경우에는 DGC 처리 4시간 후 NQO1의 발현량이 증가하다가 점차 감소하는 QR 유도활성의 양상과 유사하였다.

시간별 DGC 처리에 따른 마우스 혈장의 FRAP 활성 평가

DGC의 처리 후 시간별로 혈액을 채취하여 혈장 항산화능 (FRAP)을 측정한 결과, DGC에 의해 시간 의존적으로 철 이온의 환원되는 정도가 증가함을 확인할 수 있었다. 이로

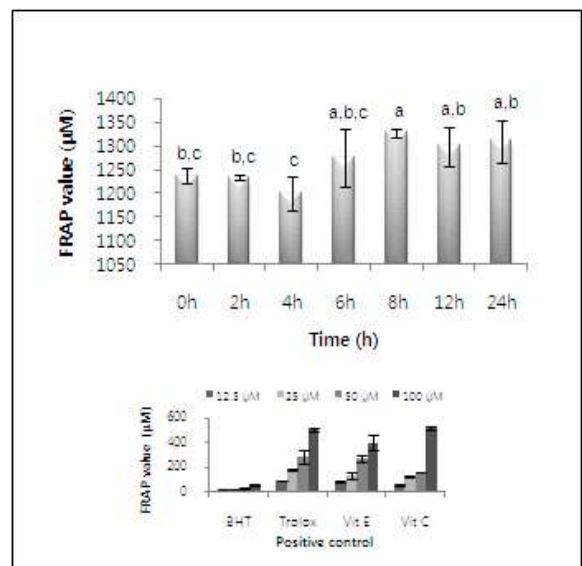


Figure 5. FRAP level in plasma from mice treated with

DGC.

미루어 볼 때 마우스의 체내에서 DGC로 인해 항산화활성이 증가되었음을 알 수 있다 (Figure 5).

요약

예로부터 다양한 방면에서 약용식물로 널리 사용되어 온 감초에서 분리한 dehydroglyasperin C (DGC)는 이전의 연구에서 세포 모델계에서 비교적 높은 항산화 능력과 2상 해독효소계 활성을 유도하는 것이 확인되었으나, 동물 모델계에서 DGC의 항산화능과 2상 해독효소계를 평가하였을 때, 유의적 결과가 관찰되지 않았다. 따라서 DGC 처리 시간에 따라 마우스의 장기 및 혈장에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기로 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 시간 동안 DGC를 처리한 후, 장기별 QR 유도활성과 간과 신장에서의 단백질 발현 패턴, 혈장의 항산화능력을 측정하였다. 그 결과 DGC 처리에 의한 QR 유도활성은 위, 대장에서 시간에 따라 변화하는 경향을 보였고, 간, 신장, 소장, 폐에서는 큰 경향성이 나타나지 않았으며, 2상 해독효소의 단백질 발현 패턴은 간에서는 역시 큰 경향성이 나타나지 않았고 위에서는 QR 유도활성과 유사한 경향이 나타남을 확인하였다. 혈장의 DGC 처리 시간에 따른 항산화활성은 시간에 따라 유의적으로 값이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 DGC는 처리 시간에 따라 각 장기 및 혈장에 각기 다르게 영향을 미치는 것으로 사료되며, 앞으로도 추가적인 연구를 통하여 DGC의 효능을 보다 구체적으로 검증하는 것이 필요한 것으로 생각된다.

사사

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0009782)

참고문헌

- Benson AM., Hunkeler MJ, Talalay P (1980) Increase of NAD(P)H:Quinone reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5216-5520.
- Benzie IEF, Strain JJ (1996) The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346-356.

- Seo JY, Lee SL, Kim HJ, Lim SS, Lim JS, Lee IA, Lee CH, Park JHY, Kim JS (2010) Dehydroglyasperin C Isolated from Licorice Caused Nrf2-Mediated Induction of Detoxifying Enzymes. *J Agric Food Chem* 58: 1603-1608.
- Seo JY, Kim YJ, Nam DH, Annalene garcia, KIM HJ, Lee IA, Lim SS, Lee CH, Park JHY, Kim JS (2009) Protective Effect of Dehydroglyasperin C isolated from licorice against carbon tetrachloride-induced tissue damage in mice model. 2009 International symposium and annual meeting, pp. 377-377.
- Shibata SA (2000) drug over the millennia: Pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi* 120: 849-862.
- Thimmulappa RK, Rangasamy T, Alam J, Biswal S (2008) Dibenzoylmethane activates Nrf2-dependent detoxification pathway and inhibits benzo(a)pyrene induced DNA adducts in lungs. *Med Chem* 4: 473-481.
- Wang ZY, Nixon DW (2001) Licorice and cancer. *Nutr Cancer* 39: 1-11.