

염생식물 광나무(*Ligustrum japonicum*)의 항산화 활성

백승오¹, 김호준¹, 정희정², 주은신¹, 공창숙³, 서영완^{1,2*}

Antioxidant Activity of the Halophyte *Ligustrum japonicum*

Seung Oh Baek¹, Hojun Kim¹, Heejeong Jeong², Eunsin Ju¹, Chang-Suk Kong³, and Youngwan Seo^{1,2*}

Received: 17 October 2015 / Revised: 26 November 2015 / Accepted: 7 December 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Dried samples of *Ligustrum japonicum* were extracted twice: with methylene chloride and with methanol (MeOH), respectively. The combined crude extracts were successively fractionated into *n*-hexane, 85% aqueous methanol (85% aq.MeOH), *n*-butanol (*n*-BuOH), and water fractions by liquid-liquid partition. Antioxidant activities of crude extract and its solvent fractions were evaluated by measuring authentic ONOO⁻, and ONOO⁻ generated from 3-morpholin-sydnonimine (SIN-1) as well as degree of occurrence of intracellular ROS in HT 1080 cells, and genomic DNA oxidation. The 85% aq.MeOH and *n*-BuOH fractions exhibited the good antioxidant activity. Further purification of the 85% aq.MeOH fraction led to the isolation of Oleanolic acid (1), Maslinic acid (2), and Ursolic acid (3). All compounds showed the significant antioxidant effects in all assay systems.

Keywords: *Ligustrum japonicum*, Antioxidant, Reactive oxygen species (ROS), Peroxynitrite

1. INTRODUCTION

정상적인 생리 조건에서 산소분자는 자유 라디칼을 발생시키는 일련의 반응을 겪으며 대사과정중에 소모되는 산소의 약 2-5%는 자유 라디칼로 변환되는 것으로 알려져 있다. 자유 라디칼은 활성산소종 (ROS, reactive oxygen species)와 활성질소종 (RNS, reactive nitrogen species)로 나누어 진다. Superoxide anions, peroxy, alkoxy, hydroxyl radicals, singlet oxygen 등은 ROS에 속하며 nitric oxide와 nitrogen dioxide radical 들 및 peroxynitrite는 RNS에 속한다. 이러한 자유 라디칼들은 단백질, 지방산, 핵산 등과 상호작용함으로써 신체 항상성을 유지하는 과정에 중요한 역할을 하며 생체에 필수적인 산화환원과정에서 중간체로서 작용하게 된다 [1,2].

기본적으로 생체내에서 생성되는 ROS는 항산화 방어기작에 의해서 모두 소거되어 진다. 하지만 생체내 항산화 방어 체계가 제대로 역할을 못해 줄 때 세포의 구성성분을 손상시켜 자가면역반응, 산화적 혹은 질산화적 스트레스를 야기시킨다. 일반적으로 다세포 생물에서 ROS의 생성과 항산화 방어기작 사이의 불균형에 의해서 초래되는 산화적 스트레스는 산화환원 신호전달 체계에 이상을 일으켜서 심혈관이나 다른 만성질환을 야기시킨다 [3-6].

현재 널리 사용되는 항산화제는 합성물질인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) 등이 있으나 이들은 부차적으로 나타나는 독성을 가지고 있어 이들을 대체할 수 있는 천연 항산화제에 대한 탐색이 이루어져 왔다. 본 연구팀은 천연자원으로부터 항산화제를 탐색하는 과정에서 우리 나라에 서식하는 염생식물들중에 하나인 광나무의 유기 추출물이 항산화 활성을 가짐을 확인하였다 [7,8].

광나무 (*L. japonicum*)는 우리나라 남해안 해안가의 산기슭

¹한국해양대학교 해양생명과학부

¹Division of Marine Bioscience, Korea Maritime & Ocean University, Busan 606-791, Korea
Tel:+82-51-410-4328, Fax:+82-51-404-4750
e-mail: ywseo@kmou.ac.kr

²한국해양대학교 해양과학기술전문대학원

²Ocean Science & Technology School, Korea Maritime & Ocean University, Busan 606-791, Korea

³신라대학교 식품영양학과

³Department of Food and Nutrition, College of Medical & Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

에 자생하는 염생식물로서 풀무레나무과 쥐똥나무속에 속한다. 이 나무는 예전부터 간과 심장을 강화하고 악성종양, 통증완화, 치주염, 화상 등의 치료에 사용되어 왔다 [9,10]. 광나무의 생리활성으로는 메탄올 추출물의 뇌보호 효과와 광나무 물증탕 추출물의 DPPH와 ABTS 라디칼과 같은 일부 항산화 활성이 보고된 바 있다 [11,12]. 따라서 본 연구에서는 우리 나라에 서식하는 광나무의 유기 추출물 및 용매 분획물을 제조하여 peroxynitrite 소거능, 세포내 ROS의 소거효과, DNA 산화 억제 등을 측정함으로써 광나무 항산화 활성을 확인하여 항산화제 개발의 새로운 원천으로의 활용 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 기기 및 시약

사용된 모든 유기용매는 사용하기 전 정제하여 실험에 사용하였으며, L-ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPH), DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid (DL-penicillamine), dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 3-morpholin-osydnonimine (SIN-1)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 peroxynitrite (ONOO)는 Santa-cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서, AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit는 Bioneer Inc (Alameda, CA, USA)에서 구입하였다. 물질분리는 Dionex P580 pump (Dionex corporation, Sunnyvale, CA, USA)와 Varian 350 refractive index detector (Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA)로 구성된 high performance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 수행하였다.

2.2. 시료의 추출, 분획 및 화합물의 분리

본 실험에서는 2013년 제주도에서 채집하여 건조한 광나무 시료 (잎과 줄기)를 methylene chloride (CH_2Cl_2) 용매에 24시간 동안 침지 후 여과하여 methylene chloride 추출물을 얻었으며, 이 과정을 2회 실시하였다. 남은 잔사에 동량의 methanol (MeOH) 용매를 첨가하여 동일한 과정으로 methanol 추출액을 얻었다. 이렇게 얻어진 추출액을 감압회전증발기 (rotavapor)를 이용하여 용매 제거를 한 후, CH_2Cl_2 추출물 25.8 g과 MeOH 추출물 176.7 g을 얻었다. 각각의 추출물을 합한 후에 용매분획을 실시하였다. 먼저 동량의 CH_2Cl_2 와 H_2O 의 혼합액을 만들어 층을 분리한 후, 분리된 CH_2Cl_2 층을 2차 분획하여 *n*-hexane 층 (19.1 g)과 85% methanol 수용액층 (85% aq. MeOH, 18.3 g)을 얻었고, H_2O 층도 2차 분획하여 *n*-butanol 층 (*n*-BuOH, 46.3 g)과 water 층 (5.2 g)을 얻었다.

85% aq.MeOH 분획물 (8.1 g)을 MeOH과 H_2O 의 혼합용매를 사용하여 C_{18} reversed-phase vacuum flash chromatography를 실시하였으며 모두 7개의 분획 (50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq.MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc)을 얻었다. 그 중

100% MeOH 분획에 대한 reverse-phase HPLC (ODS-A, 95% aq.MeOH)를 실시하여 Oleanolic acid (1), Maslinic acid (2), Ursolic acid (3)을 각각 5.1, 3.5 17.6 mg 얻었다 (Fig. 1).

2.3. 항산화 활성

2.3.1. 세포배양

인간섬유육종 세포주인 HT-1080 (human fibrosarcoma cell) 세포는 한국세포주 은행 (KCLB, Korean cell line bank)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM을 사용하여 7°C, 5% CO_2 배양기 (Forma scientific, Japan)에서 배양하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS buffer로 세척한 후 0.05% trypsin - 0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 침전된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하였으며 75 mL cell culture flask에 10 mL씩 일정 수 분할하여 주입한 후에 6~7일마다 반복 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

2.3.2. Peroxynitrite 소거능 실험

ONOO⁻ 소거 활성은 Kooy 등의 방법에 따라 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다 [13]. ONOO⁻는 DHR13과 반응하여 형광성 물질인 rhodamine 123으로 바뀌게 되므로, rhodamine 123에 ONOO⁻와 SIN-1을 처리하고 그 반응 생성물의 흡광도를 측정하여 시료의 peroxynitrite 소거능을 측정하였으며 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)와 penicillamine을 사용하였다.

DHR 123은 dimethylformamide에 녹여 질소로 퍼지시켜 80°C에 보관하였고, DHR 123 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서 조제하여 사용하였다. 완충용액은 90 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합한 후 pH를 7.4로 조절하여 100 M DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid)를 혼합하여 냉장보관하였고, 이 완충용액으로 DHR 123을 5 M로 희석하여 실험에 사용하였다. DHR 123 완충용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치 후, Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 $\lambda_{\text{excitation}}$ 485 nm, $\lambda_{\text{emission}}$ 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실시하여 1시간동안 방치한 후 측정하였다. 이는 SIN-1이 NO와 O_2 를 동시에 발생시켜 ONOO⁻를 생성시키는 화합물이기 때문에, DHR 123를 급속하게 산화시키는 authentic peroxynitrite와 다르게 DHR 123를 점진적으로 산화시키기 때문이다. Blank는 0.3 N NaOH를 사용하였고, 실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

2.3.3. ROS(reactive oxygen species) 소거능 실험

세포내 활성산소종 소거효과는 섬유육종 세포인 HT 1080을 사용하였으며, 비형광물질인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein

diacetate (DCFH-DA)가 세포내 생성된 자유 라디칼과 반응하여 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 산화되는 원리를 이용하여 측정하였다. 각 추출물과 용매 분획물은 100, 50, 10, 1 µg/mL의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 500 M의 H₂O₂로 처리한 control과 시료와 H₂O₂로 모두 처리하지 않은 blank를 실험에 사용하였고, DCF fluorescence 값은 0분부터 120분까지 30분 간격으로 측정하였다.

세포 내 자유라디칼 생성 정도는 DCF-DA assay로 측정하였다. 섬유 육종 세포 HT 1080은 96 well plate에 5×10³ cells/well로 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 희석한 20 µM의 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCF-DA, fluorescence probe)를 첨가하여 20분간 배양하였다. 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA를 제거하고 PBS로 씻은 후 2시간 동안 500 µM의 H₂O₂를 처리하였다. 세포 내 자유라디칼 생성 정도는 Victor3 multilabel plate reader를 이용하여 λ_{excitation} 485 nm, λ_{emission} 528 nm에서 DCF (2',7'-dichlorofluorescein) 형광강도를 측정하였다 [14].

2.3.4. Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA 산화 생성물 측정 실험

실험에 사용한 genomic는 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit를 이용하여 HT 1080 세포로부터 추출하였다. 추출한 genomic DNAsms 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 순도와 농도를 정량한 후, -20°C에서 냉동보관하여 사용하였다.

0.5~1.0 µg의 genomic DNA에 4 µL의 H₂O와 600 µM의 FeSO₄, 0.5 mM의 H₂O₂를 각각 10 µL씩 가하여 genomic DNA를 30분간 상온에서 산화시킨 뒤 130 mM의 EDTA를 가하여

반응을 중지시켰다. 산화된 genomic DNA는 6X agarose gel loading buffer와 혼합하여 1% agarose gel에 loading한 후 100 mV로 전기영동하였다. 전기영동을 마친 gel은 5 µg/mL EtBr에 20~30분간 염색시켜 UV를 통해 산화된 정도를 확인하고 사용된 시약의 농도와 양을 조절하여 실험하였다 [15].

2.3.5. 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석 (ANOVA)을 행한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균 (mean) ± 표준오차 (standard error of mean, SEM)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 statistic analysis system v9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계 프로그램을 이용하여 처리하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 항산화 활성

3.1.1. Peroxynitrite 소거능

Peroxynitrite (ONOO⁻)는 DHR 123과 반응하여 형광성 물질인 rhodamine 123으로 바뀌게 되므로, DHR 123에 ONOO⁻와 SIN-1을 처리한 후 그 반응 생성물의 흡광도를 측정하여 광나무 시료의 peroxynitrite 소거능을 검토하였다. 대조군 (control)으로는 vitamin C와 penicillamine을 사용하였으며, 추출물과 각각의 용매분획물, 그리고 대조군을 200, 100, 50, 10, 1 µg/mL의 농도로 희석하여 사용하였다.

Authentic ONOO⁻를 추출물로 처리하였을 때 농도의존적으로 높은 소거 활성을 보였으며, 10 µg/mL의 농도에서도 약 72.5%의 ONOO⁻ 소거 활성을 나타냈다. 용매분획물에서는 모든 분획들이 유의적인 ONOO⁻ 소거 활성을 보였으며 특히

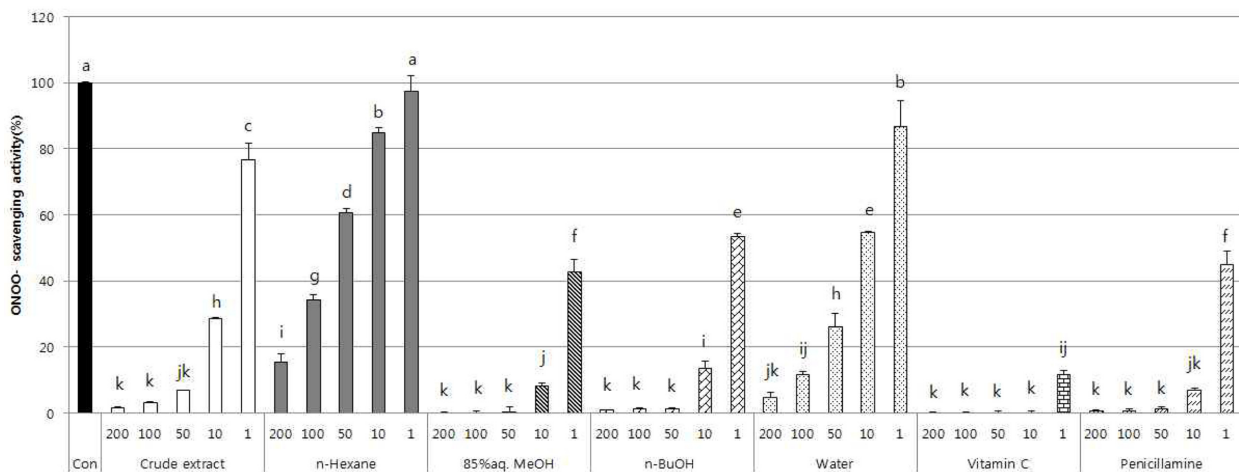


Fig. 1. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from *Ligustrum japonicum* on authentic peroxynitrite. ^{a-k}Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol, 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, n-BuOH: n-butanol.

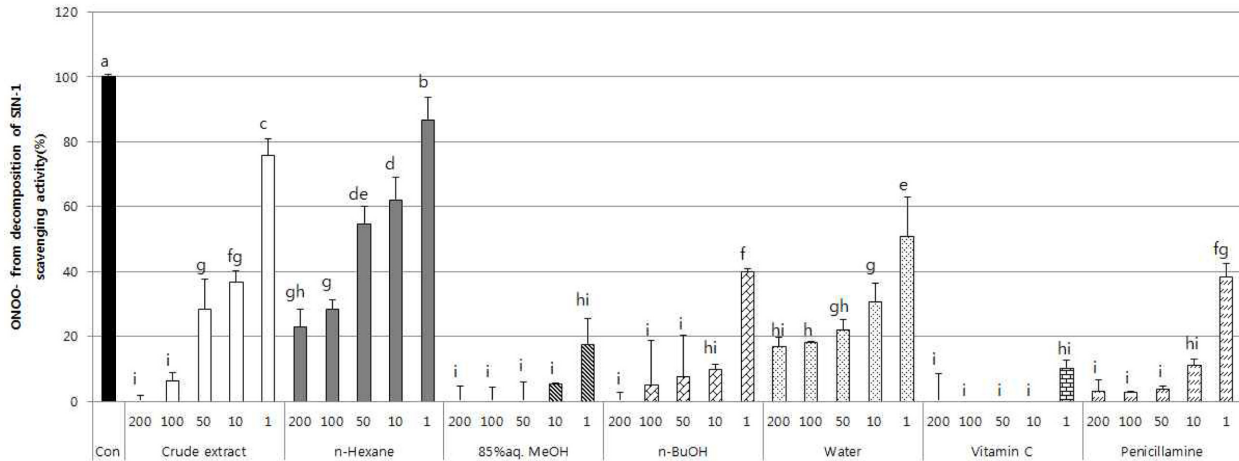


Fig. 2. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from *Ligustrum japonicus* on peroxynitrite from the decomposition of SIN-1. ^{a-h}Means with the different letters at the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol, 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

85% aq.MeOH 분획과 *n*-BuOH 분획은 10 μg/mL의 농도에서도 각각 91.5, 86.2% 이상의 높은 ONOO⁻ 소거 활성을 나타냈다. 이는 동일한 농도로 보았을 때, 대조군으로 사용한 penicillamine의 92.5% 소거 활성과 큰 차이가 없었다 (Fig. 1).

SIN-1에서 유도된 peroxynitrite를 추출물로 처리하였을 때 높은 소거 활성을 보였으며, 10 μg/mL의 농도에서 약 63.2%의 ONOO⁻ 소거 활성을 나타냈다. 용매 분획물에서도 모든 용매분획층이 농도 의존적인 활성을 보여 주었으며 역시 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획물에서 뛰어난 활성을 나타내어 10 μg/mL의 농도에서 각각 94.8, 90.2%의 소거능을 보였다. 이것은 동일 농도에서 대조군으로 사용된 penicillamine의 89% 소거 활성보다 오히려 높은 활성을 보여주었다 (Fig. 2).

3.1.2. 세포내 ROS (reactive oxygen species) 소거능

DCFH-DA가 세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질인 DCF로 산화되는 원리를 이용하여 세포내에 존재하는 활성산소를 측정하였다. HT 1080 세포를 500 μM의 H₂O₂로 처리한 후 0, 30, 60, 90, 120분마다 활성을 측정하였다. MTT assay를 통해 세포생존율을 측정한 결과 100 μg/mL 이하의 농도에서 약 80% 이상의 세포생존율을 보였기 때문에 추출물과 각각의 용매분획물은 100, 50, 10, 1 μg/mL의 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 500 M의 H₂O₂를 처리한 control과 시료와 H₂O₂를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하여 비교하였다. 대조군으로 사용한 control은 시간이 경과함에 따라 급격한 증가를 보였으며,

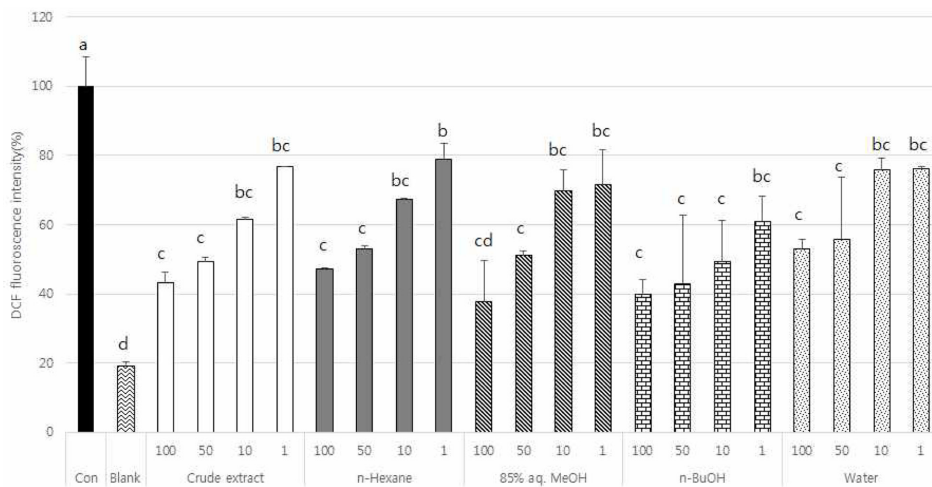


Fig. 3. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from *Ligustrum japonicus* on intracellular ROS induced by hydrogen peroxide. After preincubation of the HT 1080 cells in 20 μM DCF-DA, cells were treated with sample for 2 h. DCF fluorescence was measured following addition of 500 μM H₂O₂ at $\lambda_{excitation} = 485$ nm and $\lambda_{emission} = 528$ nm. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

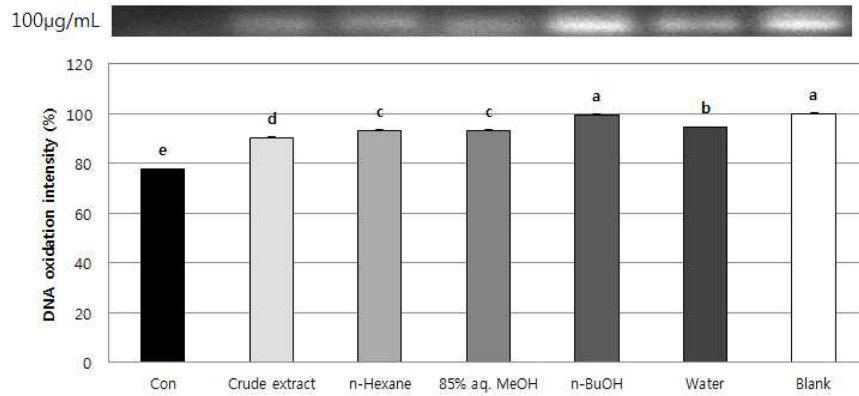


Fig. 4. Antioxidant effect of crude extract and its solvent fractions from *Ligustrum japonicum* on genomic DNA in HT 1080 cells. ^{a-e}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol, 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

blank는 그 값의 변화가 거의 없었다. 120분이 지난 후에 소거 활성을 측정 한 결과 추출물은 100 µg/mL의 농도에서 70.3%의 소거활성을 보였다. 같은 농도에서 용매분획 중에서는 85% aq.MeOH 분획이 가장 높은 77.1%의 소거활성을 보였으며 계속해서 *n*-BuOH, *n*-hexane, H₂O 분획이 각각 74.5, 65.3, 58.0%의 소거활성을 보였다 (Fig. 3).

3.1.3. Genomic DNA 산화 억제능

HT-1080 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 각 시료로 처리한 후, H₂O₂와 FeSO₄로 산화시켜 시료가 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 산화시킨 control과 시료와 H₂O₂, FeSO₄ 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다. Fig. 4는 100 µg/mL의 시료농도에서 대조군과 비교한 genomic DNA의 산화정도를 나타낸 것이다. 실험 결과, *n*-BuOH 분획층에서 96.6%로 blank와 비슷할 정도로 DNA 산화를 억제하였고, 추출물과 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, H₂O 분획층에서 각각 55.2, 69, 69.5, 75.8%의 DNA 산화억제효과가 나타났다.

3.2. 화합물 1-3의 분리와 항산화 활성

Peroxynitrite와 세포내 ROS에 대해 가장 높은 소거활성을 보였던 85% aq.MeOH 분획으로부터 트리테르페노이드 계열에 속하는 3개의 화합물들 (1-3)이 분리되었으며, 이 물질들의 화학구조는 2D NMR 분광실험을 이용하여 각각 Oleanolic acid (1), Maslinic acid (2), Ursolic acid (3)로 결정되었다 (Fig. 5). 얻어진 NMR 분광데이터의 화학적 이동 (chemical shift) 값은 문헌에 보고된 값과 잘 일치하였다 [16-18].

분리된 화합물들에 대한 peroxynitrite (ONOO⁻) 소거능을 측정하기 위하여 각 화합물과 대조군의 농도를 100, 50, 10 µM로 희석하여 사용하였으며 authentic ONOO⁻ 소거활성검색에서는 화합물 1-3이 100 µM 농도에서 각각 63.5, 83.2, 35.8%의 소거 활성을 나타내었다. SIN-1에서 유도된 ONOO⁻에 대해서는 화합물 1-3이 100 µM의 농도에서 모두 90% 이상의 소

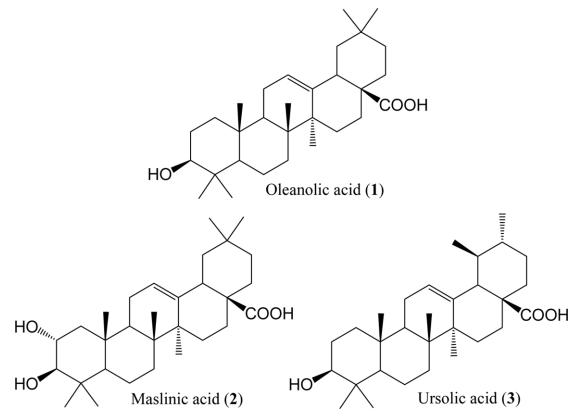


Fig. 5. Chemical structure of compounds (1-3) from *Ligustrum japonicum*.

거활성을 나타내었으며 50 µM에서는 각각 88.1, 80.8, 84.2%의 소거효과를 보여 주었다. 또한 화합물 1과 3은 10 µM 농도에서도 58.1, 61.4%의 소거활성을 나타내었다 (Fig. 6).

HT-1080 세포내에서의 ROS 소거활성을 측정하기 위해 먼저 화합물시료가 HT-1080 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통하여 확인하였다. 100, 50, 10, 1 µM의 농도에서 모든 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인한 결과 100 µM 농도에서는 세포 생존을 억제하는 효과를 보였지만, 50 µM 농도 이하에서는 80% 이상의 세포 생존율을 보여 세포 성장에 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 따라서 50, 10, 1 µM의 시료농도에서 HT-1080 세포내에 발생된 활성 산소종 (ROS)의 소거효과를 측정하였다. 대조군으로 사용한 control은 시간이 경과함에 따라 급격한 증가를 보였으며, blank는 그 값의 변화가 거의 없었다. 화합물 1-3은 2시간 후에 50 µM의 농도에서 각각 82.8, 67.5, 81.8%의 소거활성을 나타내었다 (Fig. 7).

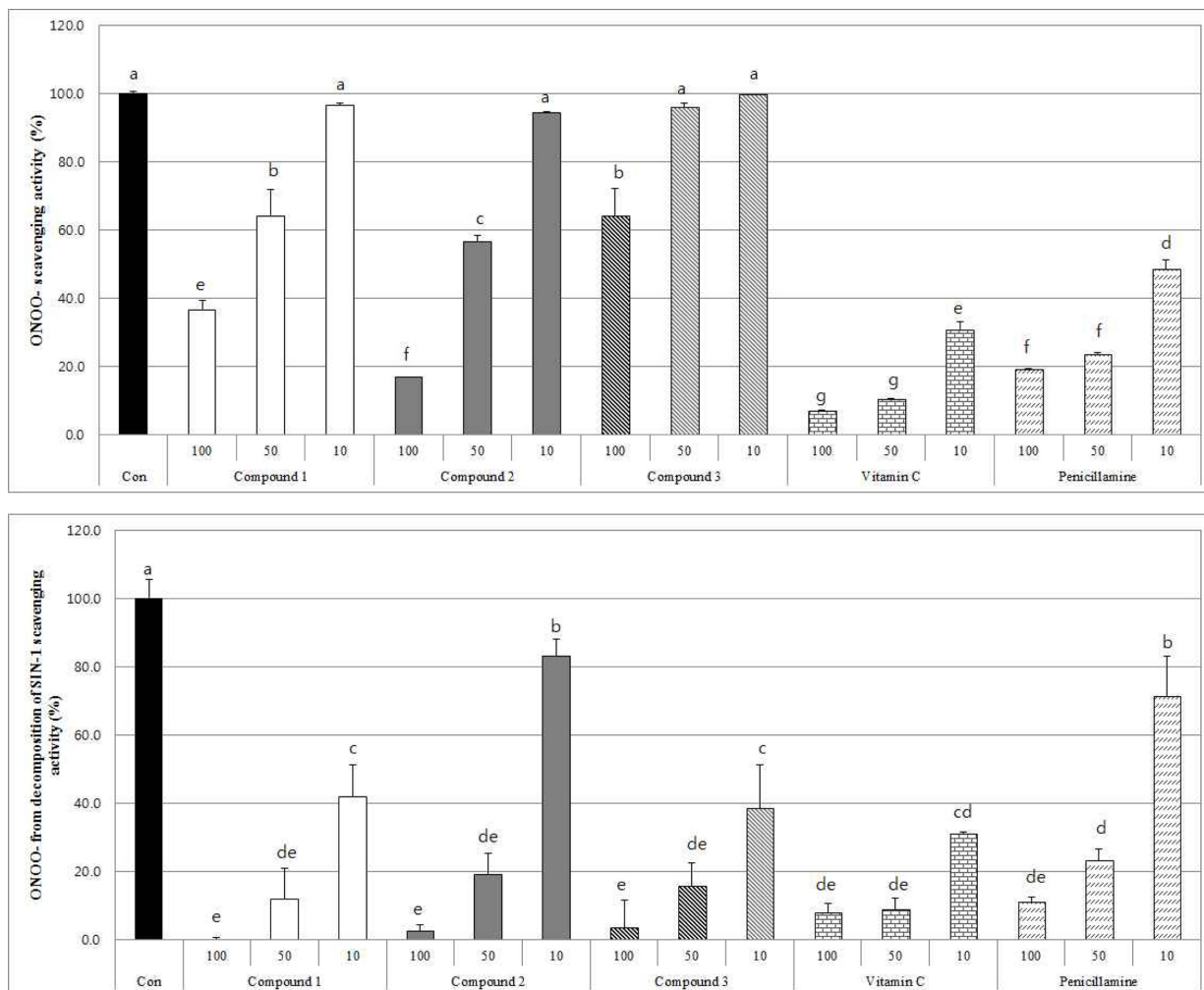


Fig. 6. Peroxynitrite scavenging activity of compounds 1-3 from *Ligustrum japonicus*. ^{a-k}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

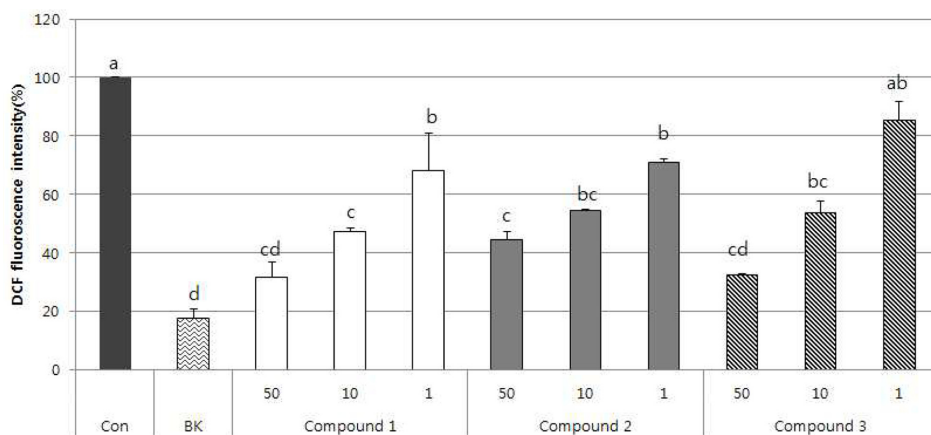


Fig. 7. Scavenging effects of compounds 1-3 from *Ligustrum japonicus* on intracellular ROS induced by hydrogen peroxide. After preincubation of the HT 1080 cells in 20 μM DCF-DA, cells were treated with sample for 2 h. DCF fluorescence was measured following addition of 500 μM H₂O₂ at $\lambda_{\text{excitation}} = 485$ nm and $\lambda_{\text{emission}} = 528$ nm. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 광나무의 추출물과 그 용매분획 (*n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, water)의 항산화 활성을 측정하기 위하여 peroxynitrite 소거능, 세포내 활성산소종 (ROS) 소거능, 그리고 DNA 산화억제효과에 대한 실험을 수행하였다. Peroxynitrite 소거능에 대해서는 85% aq.MeOH 분획이 가장 높은 소거활성을 나타내어 대조구 (control)로 사용된 L-ascorbic acid나 penicillamine에 필적하는 활성을 보여 주었으며 다음으로는 *n*-BuOH 분획이 역시 뛰어난 소거활성을 보여 주었다. HT-1080 세포내의 ROS 소거능 실험에서 역시 85% aq.MeOH 분획의 소거활성이 가장 높았으며, 그리고 *n*-BuOH 분획과 *n*-hexane 분획의 순서로 소거활성이 높게 나타났다. Genomic DNA 산화억제능 실험에서는 *n*-BuOH 분획에서 가장 높은 억제효과를 나타내었다.

Peroxynitrite와 세포내 ROS 소거에 가장 높은 소거효과를 보였던 85% aq.MeOH 분획으로부터 모두 3개의 트리테르펜류 화합물들인 Oleanolic acid (1), Maslinic acid (2), Ursolic acid (3)를 분리하여 이 물질들에 대한 항산화 활성을 측정하였다. 이 화합물들은 모두 50 μM 농도에서 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite에 대하여 80% 이상의 높은 소거능을 보였을 뿐만 아니라 화합물 1과 2는 100 μM의 농도에서 authentic peroxynitrite에 대해서도 비교적 좋은 소거능을 보여 주었다. 세포내 ROS 소거능 측정에서도 3개의 화합물 모두가 50 μM 농도에서 좋은 소거효과를 보여 주었다. 그러므로 이 3개의 화합물들은 85% aq.MeOH 분획의 높은 항산화 활성에 상당 부분 기여한 것으로 여겨진다. 하이드록시 작용기를 가진 트리테르펜류의 항산화 활성은 이미 잘 알려져 있으며 [19-25] 이러한 물질들의 항산화 활성은 하이드록시 작용기에 의해 기인되는 것으로 보고되어졌다 [19]. 화합물 Maslinic acid (2), Ursolic acid (3)도 여기와 다른 항산화활성 검색시스템에서 이미 항산화활성이 보고된 바 있다 [19-21]. 현재 85% aq.MeOH 분획과 *n*-BuOH 분획으로부터 추가적인 항산화물질의 분리에 대한 연구가 진행중에 있다.

Acknowledgements

본 연구는 2012년 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 (No. 2012R1A1A2002 851)의 연구결과입니다.

REFERENCES

1. Power, S. T. and M. J. Jackson (2008) Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88: 1243-1276.
2. Barbieri, E. and Sestili, P. (2012) Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J. Signal Transduct.* 2012: 1-17.

3. da Silva, F. M., A. Marques, and A. Chaveiro (2010) Reactive oxygen species: A double-edged sword in reproduction. *Open Vet. Sci. J.* 4: 127-133.
4. Sung, C., Y. Hsu, C. Chen, Y. Lin, and C. Wu (2013) Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013: 1-15.
5. Alfadda, A. A. and Sallam, R. M. (2012) Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 1-14.
6. Gutierrez, J. and M. S. V. Elkind (2012) Chronic inflammatory diseases and stroke: Evidence for heterogeneous mechanisms. *Ann. Neurol.* 72: S6-S7.
7. Choi, U., D.-H. shin, Y-S Chang, and J. I Shin (1992) Screening of natura antioxidant from plant and their antioxidative effect. *Korea J. Food Sci. Technol.* 24: 142-148.
8. Karre, L., K. Lopez, and K. J. Getty (2013) Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Sci.* 94: 220-227.
9. Jo, J.-O. and I.-C. Jung (2006) Phenolic compounds of *Ligustrum japonicum* leaves. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 713-720.
10. Kim, Y. J., Y. R. Lee, J. W. Cheon, and H. S. Lee (2010) Anti-aging effect of *Ligustrum japonicum* extract in the human fibroblast cells. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 36: 295-301.
11. Sung, S. Y., E. S. Kim, K. Y. Lee, M. K. Lee, Y. C. Kim (2006) A new neuroprotective compound of *Ligustrum japonicum* leaves. *Planta Med.* 72: 62-64.
12. Papoti, V. T., K. Pegklidou, E. Perifantsi, N. Nenadis, V. J. Demopoulos, and M. Z. Tsimidou (2011) Antioxidant and aldose reductase inhibition activity of *Ligustrum japonicum* and *Olea europaea* L. leaf extracts. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113: 876-885.
13. Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 16:149-156.
14. Okimoto, Y., A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita, and N. Noguchi (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* 474: 137-140.
15. Miline, L., P. Nicotera, S. Orrenius, and M. Burkitt (1993) Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Prooxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 102-109.
16. Wemer, S., S. Nebojsa, W. Robert, S. Robert, and K. Olaf (2003) Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18α-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn Reson Chem* 41: 636-638.
17. Ibrahim, T. B. and O. S. Francis (2013) Ubiquitous ursolic acid: a potential pentacyclic triterpene natural product. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2: 214-222.
18. Woo, K. W., J. Y. Han, S. U. Choi, K. H. Kim, and K. R. Lee (2014) Triterpenes from *Perilla frutescens* var. *acuta* and their cytotoxic activity. *Natural Product Sciences* 20: 71-75.
19. Choudhary, A., A. K. Mittal, M. Radhika, D. Tripathy, A. Chatterjee, U. C. Banerjee, and I. P. Singh (2013) Two new stereoisomeric antioxidant triterpenes from *Potentilla fulgens*. *Fitoterapia* 91: 290-297.
20. D'Abrosca, B., A. Fiorentino, P. Monaco, P. Oriano, and S. Paci-

- fico (2006) Annurcoic acid: A new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. Annurca apple. *Food Chem.* 98: 285-290.
21. Ramachandran, S. and N. R. Prasad (2008) Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem. Biol. Interact.* 176: 99-107.
22. Montilla, M. P., A. Agil, M. C. Navarro, M. I. Jimnez, A. Garca-Granados, A. Parra, and M. M. Cabo (2003) Antioxidant activity of Maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* 69: 470-472.
23. Liu, C.-H., M.-H. Yen, S.-F. Tsang, K.-H. Gan, H.-Y. Hsu, and C.-N. Lin (2010) Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *Food Chem.* 118: 751-756.
24. Qiao, A., Y. Wang, L. Xiang, Z. Zhang, and X. He (2014) Triterpenoids of sour jujube show pronounced inhibitory effect on human tumor cells and antioxidant activity. *Fitoterapia* 98: 137-142.
25. Qiao, A., Y. Wang, L. Xiang, Z. Zhang, and X. He (2015) Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. *J. Funct. Foods* 13: 308-313.