

그라비올라로부터 분리된 Kaempferol 및 Nicotiflorin의 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호 효과와 그 메커니즘

박소현 · 신혁수 · 이난희 · 홍인기 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과 화장품융합기술연구소, 코스메틱 용·복합산업 지원 센터
(2017년 9월 18일 접수, 2017년 11월 13일 심사, 2017년 11월 18일 채택)

Cellular Protective Effects and Mechanisms of Kaempferol and Nicotiflorin Isolated from *Annona muricata* against $^1\text{O}_2$ -induced Damage

So Hyun Park, Hyuk Soo Shin, Nan Hee Lee, In Kee Hong, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneungro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

(Received September 18, 2017; Revised November 13, 2017; Accepted November 18, 2017)

초 록

본 연구에서는 그라비올라의 주성분인 nicotiflorin을 분리하고 그 아글리콘 성분인 kaempferol을 얻어 세포 보호 효과 및 그 보호 메커니즘을 규명하였다. L-Ascorbic acid 및 (+)- α -tocopherol을 대조군으로 하여, $^1\text{O}_2$ 로 유도된 세포 손상에 대해 nicotiflorin 및 kaempferol의 보호 효과를 측정하여 nicotiflorin < (+)- α -tocopherol < kaempferol 순으로 보호 효과가 증가하였다. L-Ascorbic acid는 세포 보호 효과를 보이지 않았다. 이들의 세포 보호 효과 메커니즘을 밝히기 위해 singlet oxygen 소광 속도 상수, 자유라디칼 소거 활성, ROS 소거 활성 및 적혈구 세포 침투율을 측정하였다. 실험 결과, kaempferol과 그 배당체인 nicotiflorin의 세포 보호 효과에 있어서 큰 차이는 세포막에의 침투가 가장 큰 요인으로 확인되었다. 대조군 L-ascorbic acid가 항산화능은 크지만 실험 조건에서 세포막에 침투가 잘 안되어 세포 보호 효과가 나타나지 않은 것으로 확인되었다. Kaempferol과 (+)- α -tocopherol의 비교를 통해 세포 침투뿐만 아니라 라디칼 소거활성 및 ROS 소거 활성도 세포 보호 효과에 기여하는 것으로 나타났다. 결론적으로, 광증감 반응으로 유도된 세포막 파괴에 대한 보호작용은 항산화제들의 세포 침투, 자유라디칼 및 ROS 소거 활성이 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

Abstract

In this study, we investigated the cellular protective effects and mechanisms of nicotiflorin and its aglycone kaempferol isolated from *Annona muricata*. The protective effect of these components against $^1\text{O}_2$ -induced cell damage was also studied by using L-ascorbic acid and (+)- α -tocopherol as controls. Kaempferol exhibited the most potent protective effect, followed by (+)- α -tocopherol and nicotiflorin. L-Ascorbic acid did not exhibit any cellular protective effects. To elucidate the mechanism underlying protective effects, the quenching rate constant of the singlet oxygen, free radical-scavenging activity, ROS-scavenging activity, and uptake ratio of the erythrocyte membrane were measured. The results showed that the cell membrane penetration is a key factor determining the cellular protective effect of kaempferol and its glycoside nicotiflorin. The result from L-ascorbic acid demonstrated that the cellular protective effect of a compound depends on its ability to penetrate the cell membrane and is independent of its antioxidant capacity. In addition, it is suggested that cellular protective effects of kaempferol and (+)- α -tocopherol depend not only on the cell permeability, but also on free radical- and ROS-scavenging activities. These results indicate that the cell permeability and free radical- and ROS- scavenging activities of antioxidants are major factors affecting the protection of cell membranes against the oxidative damage induced by photosensitization reaction.

Keywords: cellular protective effect, kaempferol, nicotiflorin, antioxidant mechanism

1. 서 론

최근 화장품 및 의학 산업에서는 피부노화 관련 연구가 활발하게 진행되고 있다. 노화는 내인성 노화(intrinsic aging)와 외인성 노화(extrinsic aging)로 나눌 수 있다. 내인성 노화는 시간이 지남에 따라 진행되는 자연적인 노화를 말하고, 외인성 노화는 자외선, 담배 연기, 미세먼지 등과 같은 환경인자들에 의해 진행되는 노화를 말한다. 특

[†] Corresponding Author: Seoul National University of Science and Technology, Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, 232 Gongneungro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr

히 자외선 노출은 외인성 노화의 주요 원인으로 자외선에 노출된 피부는 라디칼 및 활성산소의 작용을 포함하는 산화적 스트레스 환경에 놓이게 된다. 이러한 산화적 스트레스는 피부 세포 구성 성분들인 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 분자들이 산화적 손상을 가져온다. 뿐만 아니라 결합 조직을 파괴시키는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 촉진시켜 콜라겐 및 엘라스틴 등의 생체 고분자를 분해하고, 세포막 성분인 인지질을 산화시켜서 세포를 파괴한다. 이러한 세포 손상은 심각한 문제를 야기할 수 있다[1-8]. 이러한 산화적 스트레스가 지속적으로 일어나면 세포 손상 뿐만 아니라 피부 노화가 촉진되고 암과 같은 질병 발생 등 심각한 문제가 야기될 수도 있다[9,10].

자외선의 작용으로 발생하는 광산화적 손상 및 노화의 원인 물질에는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 있다. ROS는 유해한 산소종으로, 종류에는 singlet oxygen (1O_2), superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), alkoxyl radical ($\cdot OR$) 및 hydroperoxyl radical ($\cdot OOR$) 등이 있다. 자외선에 의해 ROS가 생성되는 반응 중에서 광증감 반응은 특히 중요한 반응이다. 체내에는 porphyrin이나 riboflavin과 같은 광증감 물질이 존재한다. 이러한 광증감 물질이 자외선에 노출되면 피부에서는 광증감 반응이 일어난다. 광증감 반응은 1O_2 을 비롯한 다양한 종류의 ROS를 생성시킨다. 광증감 반응은 Type I 반응과 Type II 반응으로 나눌 수 있다. Type I 반응은 라디칼 또는 라디칼 이온이 생성되는 반응이고, Type II 반응은 다양한 종류의 ROS가 생성되는 반응이다. Type II 반응의 주 생성물은 1O_2 이고, 이외에도 부가적으로 다양한 ROS가 생성되는데, 1O_2 은 반응성이 매우 큰 ROS로 생체 내에는 이를 제거할 수 있는 효소가 없고 특히 세포막 파괴 및 조직 손상에 주도적 역할을 할 수 있다[11-13].

피부에는 활성산소에 의한 손상을 예방하거나 회복하기 위해 다양한 항산화 방어망이 구축되어 있다. 항산화 방어망은 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase 등의 항산화 효소와 vitamin E, vitamin C, glutathione 등과 같은 비효소적 항산화제들로 구성되어 있다. 하지만 이러한 보호 작용에도 불구하고 지속적인 외부요인에 의해 활성산소가 과잉 생성됨으로써 항산화 네트워크가 붕괴되면 피부의 세포, 조직 및 구성성분들은 산화적 손상을 받게 되고 피부 노화는 가속화될 수 있다[14-16]. 이와 같은 이유로 항산화 방어 시스템을 보완해줄 수 있는 천연 및 합성 항산화제 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에 크게 각광받고 있는 분야인 천연 항산화제의 경우는 합성 항산화제와 비교하여 상대적으로 안전성이 높은 장점이 있다. 천연 항산화제 중 가장 활발하게 연구가 되고 있는 분야는 식물유래 항산화제로 플라보노이드와 같은 페놀성 화합물들이 주성분이다. 천연의 플라보노이드는 대부분 배당체 형태로 존재하지만 당이 없는 아글리콘 성분들은 피부 흡수 및 항산화능이 배당체보다 일반적으로 더 크다. 이러한 연구들은 저자들의 선행 연구에서도 여러 번 보고한 바가 있다[17-19].

그라비올라(*Annona muricata*)는 남미·북미·필리핀·인도네시아 등 열대지방에서 재배되는 목련목 포도나무과로, 염증, 류마티즘, 당뇨병, 고혈압, 불면증 및 기생충 감염 등을 포함한 질병의 치료에 광범위하게 사용되어 왔다. 최근 그라비올라 추출물의 항산화 활성이 보고된 바 있다. 그 주성분으로는 nicotiflorin 등이 확인되었다[20,21]. Nicotiflorin은 kaempferol의 배당체로 식물의 잎에 주로 함유되어 있으며, 항산화 활성에 대한 연구는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼을 이용한 라디칼 소거활성만 보고되고 있다. 반면에 nicotiflorin의 아글리콘인 kaempferol에 대한 항산화 활성에 대한 보고는 있

으나, 그 배당체인 nicotiflorin과 비교하여 라디칼 소거활성, ROS 소거활성 및 1O_2 으로 유도된 세포 손상에서의 세포 보호 효과에 대한 비교연구는 보고된 바 없다. 따라서 이번 연구에서는 그라비올라 잎 부위에 포함된 nicotiflorin과 아글리콘 분획하여 얻은 kaempferol을 대상으로 항산화 활성과 세포 보호 효과를 측정하고 그 메커니즘을 연구하여 이를 보고하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF), H_2O_2 , luminol, heparin, rosebengal, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, trizma base, HCl 그리고 H_2SO_4 , 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 실험에 사용한 그라비올라 잎은 2017년 5월 경동시장에서 구입하였다. Silica gel 60 F₂₅₄ thin layer chromatography (TLC)는 Merck (USA)사에서 구입하였다. 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol, L-ascorbic acid는 Sigma-Aldrich (Korea)를 통해 구입하였다.

적혈구 광용혈 실험에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을, UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH 미터는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였으며, 물질분석을 위해 HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 Shim-pack VP-ODS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 제품을 사용하였다.

2.2. 추출, 분리 및 분획

건조된 그라비올라 잎 200 g을 50% 에탄올 3 L로 추출하였다. 비극성 성분을 제거하기 위해 50% 에탄올 추출물을 n-헥산으로 처리한 후 에틸 아세테이트로 분획하였다. 에틸 아세테이트 분획을 100% 에탄올에 용해시키고, ethyl acetate : acetic acid : formic acid : distilled water (8 : 1 : 1 : 1)로 구성된 전개 용매를 사용하여 유리 TLC 판에 전개시켰다. 그라비올라 잎 에틸 아세테이트 분획에서 주성분으로 밝혀진 nicotiflorin의 밴드(R_f 0.18)를 50% 에탄올로 추출한 다음, 건조시키고 100% 에탄올에 용해시켰다.

Nicotiflorin으로부터 kaempferol을 얻기 위해 산 가수분해 방법을 이용하였다. Nicotiflorin에 5% H_2SO_4 용액을 첨가한 후 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화시킨 후, 증류수로 씻고 에틸 아세테이트로 분획한 다음 건조시켰다. 얻어진 kaempferol은 실험에 사용하기 위해 100% 에탄올에 용해하였다. Kaempferol과 nicotiflorin의 화학 구조를 Figure 1에 나타내었다.

2.3. Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

2.3.1. 적혈구 분산액 제조

적혈구는 heparin이 첨가된 시험관에서 4 °C의 냉장고에 보관하였고 12 h 이내에 이용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에

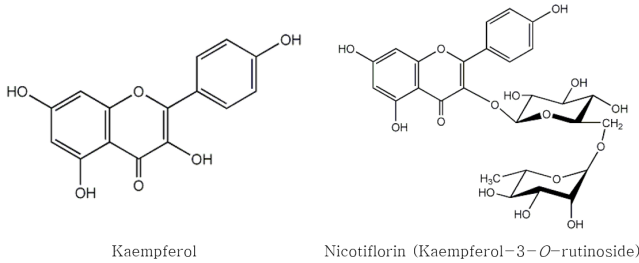


Figure 1. Chemical structures of the kaempferol and nicotiflorin (kaempferol-3-O-rutinoside).

행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6 이 되도록 제조되었으며, 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells/mL로 계산된다.

3.2.2. 광용혈 억제 효과

1.5×10^7 cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료를 농도별로 각각 50 μL 씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 간 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose-bengal (13 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광 조사하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm \times 20 cm \times 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행 이 되도록 배열한 후 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 시간 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)를 통해 평가하였다. 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 $^{\circ}\text{C}$ 항온실에서 진행되었다.

적혈구의 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ_{50} 이 25.0 min으로 오차 범위 ± 1.0 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

2.4. Singlet oxygen 소광 속도 상수

Singlet oxygen 소광 속도 상수 실험법은 이전 연구에 명시된 방법을 참조 및 응용하여 진행하였다[22]. 광증감제로 rose-bengal을 사용하였으며, 광증감 반응으로 발생된 $^1\text{O}_2$ 양의 측정에는 DPBF를 이용해 측정하였다. DPBF는 $^1\text{O}_2$ 에 대하여 물리적 소광 작용을 하지 않고 화학적 소광만을 한다고 알려져 있다. 따라서 DPBF는 $^1\text{O}_2$ 과 정량적으로 반응하기 때문에 DPBF의 감소량을 측정함으로써 $^1\text{O}_2$ 의 양을 측정할 수 있다.

메탄올을 용매로 사용하여 rose-bengal 24 μM , DPBF 15, 30, 60, 90 μM 을 준비하였다. 시험관에 rose-bengal 1 mL, DPBF 1 mL를 넣고, 메탄올로 제조한 다양한 농도의 시료 1 mL를 첨가한 후 1 min간 조사하였다. 조사 전과 후에 DPBF의 λ_{max} 인 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같은 과정을 이용하여 DPBF의 4개의 농도에 대해 각각의 흡광도 감소를 측정하였다. 또한 시료에 대해서도 최소 4개의 농도에 대해 위와 같은 과정을 반복한 뒤, Stern-Volmer식을 이용하여 $^1\text{O}_2$ 소광 속도 상수인 K_q 값을 구할 수 있었다[22]. 공시험(Blank)으로 DPBF를 제외한 rose-bengal 1 mL, 메탄올 1 mL, 시료 1 mL를 시험관에 넣고 410 nm에서 흡광도를 측정하여 rose-bengal과 시료의 영향을

보정하였다. 모든 과정은 암실에서 진행하였다.

2.5. 자유라디칼 소거 활성

자유라디칼 소거 활성을 알아보기 위해 DPPH법을 이용하였다. 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 시료 1 mL를 혼합하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 UV/Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 DPPH 시약을 넣지 않은 것을 공시험(blank), 시료를 넣지 않은 것을 대조군(control), 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 계산하였다. 자유라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, $\mu\text{g}/\text{mL}$)로서 표기하였으며, 자유라디칼 (DPPH) 소거 활성(%)을 계산하는데 사용한 식은 다음과 같다.

$$\text{Radical Scavenging (\%)} = \left\{ 1 - \left(\frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100$$

2.6. ROS 소거 활성

ROS 소거 활성은 luminol이 활성산소종에 의해 산화되어 나타나는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 시료를 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μL 를 가한 후 35 mM luminol 80 μL 를 넣고 흔들어 섞어주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 통한 활성산소종 생성을 위해 150 mM H_2O_2 40 μL 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H_2O_2 와 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 값은 다음 식으로 활성산소 소거율(%)을 계산하였고, 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀)로 표기하였다.

$$\text{ROS Scavenging (\%)} = \left(\frac{C_{\text{pm control}} - C_{\text{pm experiment}}}{C_{\text{pm control}} - C_{\text{pm blank}}} \right) \times 100$$

2.7. 적혈구 세포 침투율

물질들이 적혈구 막 내부에 위치하는 것이 항산화 활성을 나타내는데 영향을 미치는지 알아보기 위해 적혈구 세포 침투율 실험을 진행하였다. 광용혈법을 이용한 세포 보호 효과 실험과 가장 유사한 조건에서 실험을 진행하기 위해 동일한 조건으로 실험을 진행하였다. 동일한 방법으로 적혈구 현탁액을 제조하였고, 투과율을 효과적으로 관찰하기 위해 시료의 농도는 보호 효과를 관찰한 농도 중 가장 높은 농도인 25 μM 로 설정하였다. 3.5 mL의 현탁액에 25 μM 의 시료 50 μL 를 넣고 암실에서 30 min 동안 incubation 시켰다. Rose-bengal을 대신해 0.9% saline phosphate buffer를 0.5 mL 첨가한 후 hand-mixing 시켰다. 침투하지 못한 시료를 제거하기 위해 시험관을 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하였고, 4 mL의 buffer 용액을 첨가하여 같은 과정을 3회 반복해 세척하였다. 마지막 상층액을 제거한 후 100% EtOH 4 mL를 첨가하고 10 min 동안 초음파를 가해주었다. 마지막으로 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적

Table 1. Cellular Protective Effects of Kaempferol, Nicotiflorin and 2 Reference Compounds on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Erythrocytes

Concentration (μM)	τ_{50} (half time of hemolysis) ¹⁾			
	1	5	10	25
Nicotiflorin	26.6 (\pm 0.6)	27.1 (\pm 0.7)	27.3 (\pm 0.2)	32.7 (\pm 2.4)
Kaempferol	40.0 (\pm 1.5)	58.9 (\pm 1.6)	91.9 (\pm 4.5)	206.3 (\pm 2.3)
(+)- α -Tocopherol	42.5 (\pm 1.8)	45.3 (\pm 0.5)	48.6 (\pm 5.9)	52.4 (\pm 1.6)
L-Ascorbic acid	-	-	24.5 (\pm 0.1)	25.5 (\pm 0.1)

¹⁾Control, $\tau_{50} = 25.0 \pm 1.0$ min
Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

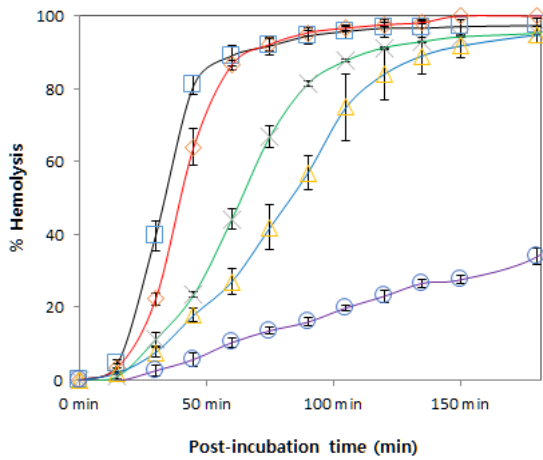


Figure 2. Cellular protective effect of kaempferol on the rose-bengal sensitized photohemolysis of erythrocytes. Concentration of kaempferol; \square : control, \diamond : 1 μM , \times : 5 μM , \triangle : 10 μM , \circ : 25 μM . Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

혈구를 침전시킨 후 상층액을 분리했다. 이렇게 얻어진 상층액을 미리 UV-scan을 통해 확인한 각 시료의 λ_{max} 파장에서 spectrophotometer를 이용해 정량하였다. 시료를 제외하고 용매를 첨가하여 동일한 과정으로 blank를 측정하였고, 이를 이용해 각 실험군을 보정하여 적혈구의 영향을 보정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 효과

피부가 자외선에 노출되면 피부에 존재하는 porphyrin과 같은 광증감제는 광증감반응을 일으켜서 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)과 같은 활성산소를 생성시킨다. 이러한 활성산소는 세포막에서 막지질 자동산화 반응과정으로 세포막을 손상시켜서 세포를 파괴시킨다. 본 연구에서는 광증감제로 알려진 rose-bengal 및 적혈구 세포를 이용하여 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 산화적 세포 손상(광용혈)에 대한 항산화제의 보호 효과를 평가하였다. 활성산소에 의해 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})으로 대조군 및 항산화제들의 세포 보호 효과를 비교 평가하였다.

본 연구에서는 활성산소로 유도된 광용혈 시스템에서, nicotiflorin 및 kaempferol을 각각 1, 5, 10 및 25 μM 의 농도로 처리하고 그 보호 효과를 확인하였다(Table 1). Nicotiflorin의 τ_{50} 은 1, 5, 10, 25 μM 에서 각각 26.6, 27.1, 27.3, 32.7 min, kaempferol은 각각 40.0, 58.9, 91.9, 206.3 min으로 농도 의존적인 세포 보호 효과를 나타내었고, kaemp-

Table 2. Singlet Oxygen Quenching Rate Constant of Kaempferol, Nicotiflorin and 2 Reference Compounds

Compounds	K_q ($\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$)
Kaempferol	1.4×10^8
Nicotiflorin	1.1×10^8
(+)- α -Tocopherol	1.7×10^8
L-Ascorbic acid	1.1×10^8

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

ferol은 그 배당체인 nicotiflorin에 비하여 농도별로 1.5, 2.2, 3.4, 6.3배 더 큰 보호 효과를 보였다. 비교 대조군인 지용성 항산화제 (+)- α -tocopherol 또한 농도 의존적인 효과를 나타냈다. 하지만 수용성 항산화제 L-ascorbic acid는 유의적인 보호 효과를 나타내지 않았다. 특히 kaempferol은 25 μM 에서 (+)- α -tocopherol에 비하여 3.9배 큰 보호 효과를 나타냈다. 농도 의존적인 kaempferol의 세포 보호 효과를 Figure 2에 나타내었다. Nicotiflorin과 비교하여 그 아글리콘인 kaempferol의 월등한 세포 보호 효과에 대한 메커니즘을 규명하고자 하였다. 이와 함께 kaempferol과 그 배당체인 nicotiflorin의 세포 보호능 차이에 대한 원인을 분석하고자 하였다.

3.2. Singlet oxygen 소광 속도 상수

세포 보호 효과가 나타날 수 있는 경로 중 하나는 Type II 광증감 반응의 주 생성물인 singlet oxygen을 효과적으로 소광시키는 것이다. 다시 말해 세포 보호 효과의 원인으로 가장 먼저 예상할 수 있는 항산화 능력이 $^1\text{O}_2$ 소광 효과이다. 광증감제인 rose-bengal에 의해 생성된 $^1\text{O}_2$ 은 매우 반응성이 큰 활성산소로 세포막에서의 라디칼 연쇄반응을 개시시키고 이어서 세포막을 파괴시킨다. 따라서 $^1\text{O}_2$ 을 소거하면 세포막에서의 라디칼 연쇄반응의 개시 단계를 차단시킬 수 있다. $^1\text{O}_2$ 소광 속도 상수 측정에는 rose-bengal을 사용하였다. 데이터는 Stern-Volmer식을 이용해 나온 K_q 값으로 나타내었다(Table 2).

$^1\text{O}_2$ 소광 속도 상수 측정에서 양성 대조군으로는 우수한 $^1\text{O}_2$ 소광제로 알려진 β -carotene을 사용하였고 본 실험에서 측정된 β -carotene의 소광 속도상수 값인 K_q 는 $2.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 으로 문헌에서 제시된 속도상수($2.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)와 유사한 결과를 나타내었다[22]. L-Ascorbic acid와 (+)- α -tocopherol의 K_q 값은 각각 $1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 및 $1.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 이었다. Nicotiflorin과 kaempferol의 K_q 값은 각각 $1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, $1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 로 나타났다. Kaempferol의 세포 보호 효과는 (+)- α -tocopherol보다 현저히 떨어졌지만 $^1\text{O}_2$ 소광 능력에서는 큰 차이를 나타내지는 않았다. 이와 같은 결과는 kaempferol이

Table 3. Radical Scavenging Activities of Kaempferol, Nicotiflorin and 2 Reference Compounds

Compounds	FSC ₅₀ (μM)
Nicotiflorin	910.0 ± 0.5
Kaempferol	6.8 ± 0.8
(+)-α-Tocopherol	12.8 ± 0.1
L-Ascorbic acid	13.9 ± 0.1

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

뛰어난 세포 보호 효과를 설명하는 데는 1O_2 소광 능력뿐만 아니라 다른 기여 인자들이 있을 것으로 판단되었다.

3.3. 자유라디칼 소거 활성

광증감 반응이 일어나면 Type I 반응으로 라디칼 종들이 생성될 수 있다. 또한 singlet oxygen에 의해 세포막 구성성분인 인지질의 탄소사슬에서 라디칼이 생성되고 이는 지질과산화 연쇄반응을 야기한다. 이렇게 생성된 산화 인지질은 탄소사슬 부위에 산소를 가지고 있기 때문에 이전과 같은 소수성 성질을 가지지 못한다. 따라서 더 이상 막 구조를 유지하지 못하고 세포 용혈 현상이 일어나게 된다.

자유라디칼 소거능이 kaempferol의 우수한 세포 보호 효과를 나타내는데 기여했는지를 알아보고자 하였다. Nicotiflorin 및 kaempferol의 라디칼 소거 활성(FSC₅₀)은 각각 910.0 및 6.8 μM로 나타났으며, 비교물질로 사용된 (+)-α-tocopherol 및 L-ascorbic acid는 12.8 및 13.9 μM로 나타났다. Kaempferol의 라디칼 소거활성은 매우 컸다. 따라서 자유라디칼 소거 활성이 세포 보호 효과에 기여한 것으로 판단된다. 반면 nicotiflorin은 매우 낮은 라디칼 소거 활성을 보였는데, 이처럼 같은 분자 구조를 가진 물질이라도 배당체의 유무가 항산화 활성에 매우 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. 따라서 배당체와 아글리콘 사이의 세포 보호능 차이를 반영한 결과라고 여겨진다. 하지만 L-ascorbic acid는 세포 보호 효과를 나타내지 않았다. *In vitro*에서 라디칼 소거 활성이 높은 것이 세포수준에서의 세포 보호 효과가 큰 것은 아님을 보여주었다.

3.4. ROS 소거 활성

Type II 광증감 반응의 주 생성물은 1O_2 이지만, 그 외에 $O_2^{\cdot-}$ 을 비롯한 다양한 ROS가 생성될 수 있다[13]. 이들 ROS들도 추가적인 산화적 스트레스를 일으켜서 세포와 조직에 손상을 가한다. 뿐만 아니라 본 연구에서 사용한 ROS 생성계는 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 시스템으로 ROS 소거활성은 킬레이팅 효과도 포함되어 있다. 즉 킬레이팅 효과에 의한 ROS 생성 억제도 항산화능에 포함되어 있다. Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서는 Fe^{3+} -EDTA와 H_2O_2 의 작용으로 Fe^{2+} -EDTA와 $O_2^{\cdot-}$ 이 생성된다. 생성된 $O_2^{\cdot-}$ 는 Fe^{3+} -EDTA를 Fe^{2+} -EDTA로 환원시킨다. 이렇게 생성된 Fe^{2+} -EDTA는 Fenton 반응에 의해 H_2O_2 와 반응하여 $\cdot OH$ 와 같은 반응성이 매우 큰 ROS를 생성시킨다. 따라서 1O_2 을 제외하고 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ 등의 대부분의 ROS가 생성되기 때문에 1O_2 을 제외한 다른 ROS의 소거 능력만을 확인하려는 목적에 부합하는 모델이라 할 수 있다. 활성산소에 의해 루미놀은 들뜬 상태인 아미노프탈산으로 되고 이어 바닥상태로 떨어지면서 420-450 nm에서 발광하는 특성을 가진다. 이 계에 항산화제를 첨가하여 화학발광이 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 ROS 소거활성(OSC₅₀) 또는 총항산화능을 나타내었다.

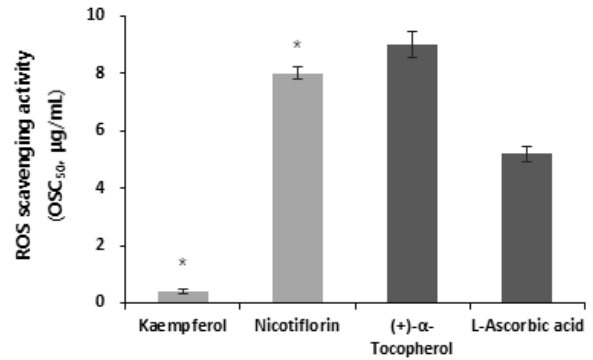


Figure 3. ROS scavenging activities of kaempferol, nicotiflorin and 2 reference compounds. Data are presented as mean ± S.D. *p < 0.05 compared with (+)-α-tocopherol and L-ascorbic acid.

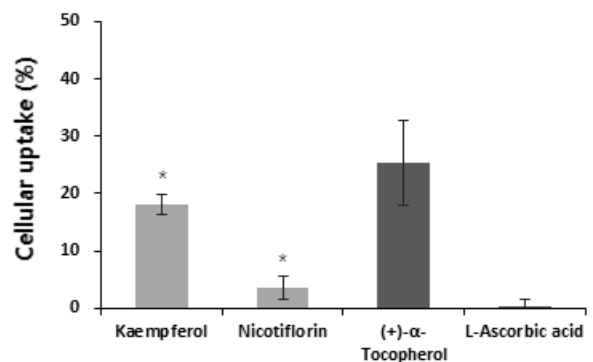


Figure 4. Erythrocyte membrane penetration efficiency of kaempferol, nicotiflorin and 2 reference compounds. Data are presented as mean ± S.D. *p < 0.05 compared with (+)-α-tocopherol and L-ascorbic acid.

Kaempferol 및 nicotiflorin의 ROS 소거 활성(OSC₅₀)은 각각 0.4 및 8.0 μM로 나타났으며, 비교물질로 사용된 (+)-α-tocopherol 및 L-ascorbic acid는 각각 9.0 및 5.2 μM로 나타났다. Kaempferol의 총 항산화능이 가장 크게 나타났으며, 이는 kaempferol의 뛰어난 세포 보호능이 자유라디칼 소거 활성뿐만 아니라 여러 가지 ROS에 대한 총 항산화능에 의한 결과라고 예상된다. Nicotiflorin의 경우에는 kaempferol보다 총 항산화능이 떨어졌지만, (+)-α-tocopherol보다 우수하였는데 이는 세포 보호 효과와 일치하지 않았다. 그러나 L-ascorbic acid는 라디칼 소거 활성과 마찬가지로 ROS 소거에서도 뛰어난 활성을 보였지만 세포 보호 효과를 나타내지 않았다.

3.5. 적혈구 세포 침투율

광증감 반응에 의해 생성된 라디칼 중, 1O_2 , 다양한 ROS는 매우 높은 반응성으로 빠른 속도로 세포를 손상시키기 때문에 항산화 물질의 위치 또한 세포 보호 효과에 영향을 미칠 수 있다. 뿐만 아니라 1O_2 에 의해 인지질 탄소 사슬에 형성되는 라디칼은 세포막 내부에 존재하면서 연쇄 반응을 일으키기 때문에 항산화 물질이 세포막 내부에 존재하지 않는다면 효과적으로 세포 용혈을 막을 수 없다. 따라서 항산화 물질이 세포와 독립적으로 존재하는 것보다 세포막 사이에 존재할 때 더 효과적인 세포 보호 효과를 나타낼 수 있다. 세포 침투율에 대한 실험 결과는 “침투량(μM)/초기에 넣어진 양(25 μM) × 100(%)”로 나타내었다(Figure 4).

그 결과, 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol의 침투율은 25.4%,

References

수용성 항산화제인 L-ascorbic acid는 0.3%이었다. L-Ascorbic acid의 세포 침투율은 낮게 나타났다. L-Ascorbic acid의 0.3%는 세포막이 아닌 세포내 존재 가능성이 더 클 수 있고 세포막에서의 자동산화반응 억제에는 그 역할을 나타내지 못할 수도 있을 것으로 판단된다. 아글리콘인 kaempferol의 경우 18.1%의 적혈구 세포 침투율을 나타내었고, 배당체인 nicotiflorin은 3.6%의 침투율을 나타내었다. Kaempferol은 nicotiflorin에 비하여 세포 침투율이 5배 컸다. Kaempferol의 큰 세포 침투율은 매우 큰 세포 보호 효과를 나타내는데 결정적 역할을 한 것으로 판단된다. 활성산소로 개시된 세포막에서의 라디칼 자동산화반응은 초기에 kaempferol이 효율적으로 차단시키면 세포를 온전히 보호할 수 있다. 한편 세포 보호 효과가 매우 낮은 nicotiflorin과 L-ascorbic acid는 세포 침투율이 매우 낮았다. 따라서 효율적인 세포 보호 효과를 나타내지 못했다. 따라서 세포 침투능은 물질의 극성도가 반영되었음을 나타낸다. (+)- α -Tocopherol은 kaempferol보다 많은 양이 세포막에 침투하였고 $^1\text{O}_2$ 소광 효과는 거의 유사했지만 세포 보호 효과가 훨씬 작았다. 따라서 kaempferol의 우수한 자유라디칼 또는 ROS 소거 활성도 세포 보호 효과에 영향을 주었음을 알 수 있었다. 반면 L-ascorbic acid는 자유라디칼 및 ROS 소거 활성이 nicotiflorin 및 (+)- α -tocopherol보다 뛰어났으나 세포 보호 효과를 보이지 않았다. 이는 L-ascorbic acid가 수용성 항산화제로 세포막 내부에 침투하지 못했기 때문으로 사료된다. 따라서 세포를 보호하기 위해서는 적혈구 세포 내에 침투하는 능력이 필수적임을 확인하였다. 결론적으로, 광증감 반응으로부터 세포를 보호하는 메커니즘에는 세포 내로 침투하는 능력, 자유라디칼 소거 활성 및 ROS 소거 활성이 중요한 요인으로 작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 그라비올라의 주성분으로 밝혀진 nicotiflorin을 분리하고 이를 아글리콘 분획하여 kaempferol을 얻음으로써 이들의 세포 보호 효과를 확인하고, 그 보호 메커니즘을 규명하였다. 비교물질로는 L-ascorbic acid, (+)- α -tocopherol을 사용하였다.

$^1\text{O}_2$ 로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과는 kaempferol > (+)- α -tocopherol > nicotiflorin >>> L-ascorbic acid 순이었다. 세포 보호 효과 메커니즘을 알아보기 위해 nicotiflorin, kaempferol 및 양성 대조군들의 $^1\text{O}_2$ 소광능, 자유라디칼 소거 활성, ROS 소거 활성을 평가하였다.

L-Ascorbic acid의 경우 자유라디칼 소거 활성, ROS 소거 활성에서 모두 높은 효과를 나타냈지만 세포 보호 효과는 나타나지 않았다. 이는 세포 침투율이 매우 낮는데 기여한 것으로 판단된다. 따라서 세포 수준에서의 보호 효과는 항산화제의 세포막 내부 존재가 중요한 것으로 생각된다[23]. (+)- α -Tocopherol의 경우 kaempferol 보다 더 낮은 세포 보호 효과를 나타내었다. (+)- α -Tocopherol은 kaempferol과 비교하여 세포 침투율은 컸고 $^1\text{O}_2$ 소광 속도 상수는 유사하였다. Type I 반응으로부터 생성되는 라디칼 종들에 대한 소거 활성과 Type II 반응으로부터 부가적으로 생성되는 각종 ROS에 대한 소거 활성은 kaempferol이 (+)- α -tocopherol보다 월등한 항산화 능력을 보였다. 이를 종합해 볼 때 세포 보호 효과는 $^1\text{O}_2$ 소광 능력, 세포 침투율, 라디칼 및 ROS 소거 활성이 모두 반영된 것으로 판단되었다.

1. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16-29 (2015).
2. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Photoageing: Mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**, 874-887 (2007).
3. H. J. Yang, E. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Psidium guajava* leaf extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34**, 233-244 (2008).
4. H. U. Simon, A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, **5**, 415-418 (2000).
5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **23**, 75-132 (1997).
6. Y. Al-Nuaimi, M. J. Sherratt, and C. E. M. Griffiths, Skin health in older age, *Maturitas*, **79**, 256-264 (2014).
7. J. Wohrab, K. Hilpert, and L. Wolff, Epidermal alternsprozesse and anti-aging strategies, *Hautarzt*, **67**, 107-111 (2016).
8. S. Valentina, M. Sören, M. Britta, B. Sascha, B. Alexander, B. Jürgen, and J. Marina, Aging of different avian cultured cells: Lack of ROS-induced damage and quality control mechanisms, *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 48-59 (2010).
9. L. G. Valle, Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans, *Biomed. Aging Pathol.*, **1**, 1-7 (2011).
10. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, **160**, 1-40 (2006).
11. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**, 510-518 (2003).
12. M. P. Montana, W. A. Massad, S. Criado, A. Biasutti, and N. A. Garcia, Stability of flavonoids in the presence of riboflavin-photo-generated reactive oxygen species: a kinetic and mechanistic study on quercetin, morin and rutin, *Photochem. Photobiol.*, **86**, 827-834 (2010).
13. D. S. Lee, M. S. Lim, S. S. Kwan, S. Y. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract, *Appl. Chem. Eng.*, **23**, 93-99 (2012).
14. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**, 680-683 (2012).
15. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, and Y. Kubota, Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Pigment Cell Res.*, **16**, 629-638 (2003).
16. M. L. Circu and T. Y. Aw, Reactive oxygen species, cellular redox system, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 749-762 (2010).
17. J. H. Ha, Y. J. Jeong, J. S. Seong, K. M. Kim, A. Y. Kim, M. M. Fu, J. Y. Suh, N. H. Lee, J. Park, and S. N. Park, Antioxidant and antibacterial activities of *Glycyrrhiza uralensis* Fisher (Jecheon, Korea) extracts obtained by various extract condition, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.*, **41**, 361-373 (2015).
18. S. H. Xuan, G. Y. Kim, J. Y. Yu, J. W. Kim, Y. R. Yang, Y. H. Jeon, Y. J. Jeong, A. R. Kim, and S. N. Park, Antioxidant and cel-

- lular protective effects against oxidative stress of *Calendula officinalis* flowers extracts in human skin cells, *Appl. Chem. Eng.*, **27**, 620-626 (2016).
19. S. H. Xuan, A. R. Kim, Y. J. Jeong, and N. H. Lee, Antioxidant and cellular protective effects of *Moringa oleifera* leaves extract, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**, 217-226 (2016).
 20. E. H. Jo, I. H. Kim, and J. H. Lee, Antioxidant and skin whitening effect of graviola (*Annona muricata*) leaf extracts, *Appl. Chem. Eng.*, **28**, 198-205 (2017).
 21. Y. R. Son, E. H. Choi, G. T. Kim, T. S. Park, and S. M. Shim, Bioefficacy of graviola leaf extracts in scavenging free radicals and upregulating antioxidant genes, *Food Funct.*, **7**, 861-871 (2016).
 22. S. N. Park and T. N. Lee, Quenching effect of carotenoids on singlet oxygen, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **10**, 75-89 (1984).
 23. S. N. Park, D. H. Won, J. P. Hwang, and S. B. Han, Cellular protective effects of dehydroeffusol isolated from *Juncus effusus* L. and the mechanisms underlying these effects, *J. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 3046-3052 (2014).