

# 覆盆子の 세포내 ROS, ONOO<sup>-</sup> 생성 및 Ca<sup>2+</sup> 증가 억제에 의한 혈관내피세포 보호작용

이철웅, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

## Cytoprotective action of *Rubi Fructus* by modulation of Reactive Oxygen Species, peroxynitrite and Ca<sup>2+</sup>

Cheol-woong Lee, Ji-Cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Objectives** : Reactive oxygen species(ROS), which include hydrogen peroxide and other chemical forms known as free radicals such as hydroxyl radical(OH<sup>·</sup>), superoxide(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), and peroxyl radicals(ROO<sup>·</sup>), are produced as part of normal and essential biological processes. Peroxynitrite(ONOO<sup>-</sup>) is a reactive oxidant formed from superoxide(·O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitric oxide(NO), that can oxidize several cellular components, including essential protein, non-protein thiols, DNA, low-density lipoproteins(LDL) and membrane phospholipids. ROS and ONOO<sup>-</sup> have contributed to the pathogenesis of diseases such as stroke, heart disease, Alzheimer's disease and atherosclerosis. Because of the lack of endogenous enzymes to thwart ROS and ONOO<sup>-</sup> activation, developing a specific scavenger is remarkably important. *Rubi Fructus* is the one of medical herbs and strengthens the kidneys to preserves the vital energy.

**Methods** : In this study, the ability of *Rubi Fructus*(1, 10, 50g/ml) to scavenge ROS and to protect cells against ROS and cell death of endothelial cell. The level of ROS was detected by staining with DCFH-DA. The level of intracellular calcium(Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>) was detected with the fluorescent method. Cell death analyses were performed using propidium iodide(PI) staining.

**Results** : *Rubi Fructus* blocked lipopolysaccharide(LPS)-induced ROS, and decreased ROS induced 3-Morpholinosydnonine(SIN-1) and tert-butylhydroperoxide(*t*-BHP). *Rubi Fructus* markedly scavenged authentic ONOO<sup>-</sup>, also inhibited ONOO<sup>-</sup> induced by ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO which are derived from SIN-1. *Rubi Fructus* inhibited intracellular Ca<sup>2+</sup> levels, and inhibited *t*-BHP-induced ROS in YPEN cells. *Rubi Fructus* also manifested cytoprotection from cell death induced by *t*-BHP.

**Conclusions** : The present study suggests that *Rubi Fructus* is a powerful antioxidant and promotes cellular defense activity in the protection against ROS and ONOO<sup>-</sup>.

**Key Words**: antioxidant, ROS, peroxynitrite, *Rubi Fructus*

### 1. 緒 論

발최근 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)  
과 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)에 의

한 oxidative stress가 노화 및 노인성 질환의 발생  
과정에 관여한다는 것이 잘 알려져 있다<sup>1</sup>.

활성산소종은 superoxide anion(·O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 비롯하  
여 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical(·OH),  
알킬 과산화물, 할로젠 산화물 등이 있는데 이들은  
구조적으로 분자 또는 원자 최외각에 하나의 부대  
전자를 가지므로 반응성이 크고 매우 불안정한 화  
합물이며, 다양한 산화효소에 의해 세포질, 세포내

· 접수 : 2005. 7. 12. · 채택 : 2005. 7. 26.  
· 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 석장동 1090-1  
동국대학교 경주한방병원 2내과  
(Tel. 054-770-1254,  
E-mail : jjcjh@paran.com)

과립(mitochondria, microsome, peroxisome) 및 cytosol에서 생성된다<sup>2</sup>. 이러한 활성산소는 세포막과 핵산의 주성분인 당질, 지질, 단백질 및 DNA와 같은 분자들을 과산화시키며, apoptosis와 같은 심각한 세포 손상을 초래한다. 또한 이것들은 대식세포의 살균작용, 오래된 단백질의 소거 등에 이용되는 필수 불가결한 물질이나 반응성이 매우 커서 생체 내에서 유해한 작용을 나타낼 수 있다<sup>3</sup>.

활성산소 중 하나인  $\cdot O_2^-$ 는 손상된 혈관에서 나오는 NO와 반응하여 강한 산화력을 가지는 ONOO<sup>-</sup>를 생성하여 고콜레스테롤증, 고혈압 등을 유발한다고 한다. ONOO<sup>-</sup>는 NO와  $\cdot O_2^-$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanidylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다<sup>3</sup>.

최근 과도한 활성산소의 생성은 동맥경화, 암, 노화, 허혈성 혈관질환, 치매 등을 유발한다고 보고되고 있다. 이러한 활성산소에 의해서 생체는 oxidative stress를 받게 되는데, 이는 혈관내피세포가 염증분자인 접착분자 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1(intracellular cell adhesion molecule-1), MCP-1(monocyte chemotactic protein-1)을 발현하게 하여 동맥경화를 유발한다<sup>3</sup>. 산화력이 강한 활성산소 및 ONOO<sup>-</sup>는 세포에 강한 산화적 스트레스를 가져와 Ca<sup>2+</sup>를 증가시켜 여러 가지 형태의 세포 손상을 초래하게 된다<sup>4</sup>. 이 때 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 증가는 세포내의 여러 효소들을 활성화시켜 세포 사멸 및 활성산소 생성을 촉진한다<sup>5</sup>. 그러므로 활성산소종과 활성질소종을 제거할 수 있는 물질을 찾는 것은 노화 과정뿐만 아니라 노인성 질환을 조절하는데 큰 의의가 있다.

覆盆子は 산딸기의 미숙한 열매를 건조한 것으로 민간에서 성기능을 강화시키는 목적으로 복용해 왔

는데 益腎固精 효능이 큰 補腎藥物로서 陽痿, 遺精, 虛損, 女子無子 등의 치료에 활용되어 왔다<sup>6</sup>. 실험 연구에 의하면 NO 활성을 조절하여 ethanol 장기 음용에 의해 유도한 발기부전을 개선시키는 효능을 나타내었으며<sup>7</sup>, 藥鍼은 抗癌 및 免疫增強 효과<sup>3</sup>와 抗酸化 작용<sup>9</sup>을 나타내었다. 또한 노화 조절 효과가 밝혀진 五子丸<sup>10</sup>을 비롯한 항노쇠 처방에 들어가는 약물이므로 補腎 효능과 함께 노화 방지 효과를 가질 것으로 보인다.

따라서 본 연구에서는 覆盆子の 노화 방지 효능을 검토하기 위한 일환으로 ROS 소거 작용과 SIN-1, t-BHP 처리에 의해 생성되는 ROS 제거 활성, ONOO<sup>-</sup> 제거 활성, 세포내의 Ca<sup>2+</sup> 농도 및 혈관내피세포 보호 작용 등에 대하여 관찰하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 약재

覆盆子(*Rubi Fructus*)를 시중에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

#### 2) 시약

3-Morpholinosydnone(SIN-1), DL-penicillamine은 Sigma chemical Co.(ST. Louis, MO, USA)에서, dihydrorhodamine 123(DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서, ONOO<sup>-</sup>은 Cayman Chemical Co.(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

覆盆子 300g을 잘게 분쇄하고 3배량의 95% methanol을 가하여 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2) 세포 배양

Rat의 혈관내피세포인 YPEN 세포를 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 75cm<sup>2</sup> tissue culture flask(Corning Co., New York, U.S.A.)에 5×10<sup>6</sup>cells/ml의 밀도가 되게 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 5% fetal bovine serum을 함유하고 여기에 glutamine(5.84μg/ml), amphotericin B (0.25μg/ml), penicillin(100U/ml) 및 streptomycin (100 U/ml)을 첨가하였다. 그리고 NaHCO<sub>3</sub>을 가하여 pH 7.4~7.6으로 조절한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM: Nissui, Tokyo, Japan)로 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

## 3) 활성산소 측정법

DCFDA assay<sup>11</sup>로 활성산소를 측정하였다. 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600U/ml esterase를 -20℃에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10μM DCFDA와 6U/esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein(DCFH) 용액을 22℃에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동 보관하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수 분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)이 되므로, 여기파장 485nm 및 방출파장 530nm에서 microplate fluorescence Genius(Tecan, Austria)로 측정하였다. 이 때 활성산소 생성원으로 총 활성산소 제거능 검토시 신장 homogenate의 postmitochondria 분획을, ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> 제거능 검토시 SIN-1(100μM), t-BHP(10μM)를 사용하였다.

4) ONOO<sup>-</sup> 측정법

Kooy<sup>12</sup> 등의 방법에 의해 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 측정하였다. 96well microplate에 覆盆子추출물을 취하고, 90 mM NaCl, 5mM KCl 및 100μM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액(pH 7.4)을 가한다. 그리고 10μM ONOO<sup>-</sup>를 첨가한 후, 형광광도계를

이용하여 여기파장 500nm와 방출파장 536nm에서 측정하였다. ONOO<sup>-</sup> 생성원으로는 시판되는 ONOO<sup>-</sup> (1, 10, 50μg/ml, Cayman Chemical CO.)와 SIN-1 (100μM)을 처리하여 생성되는 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>와 NO에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 검토하였다.

5) 세포내 Ca<sup>2+</sup> level 측정법

혈관내피세포를 96well plate에 심어서 키운 다음, Ca<sup>2+</sup> level을 측정하는 형광 염색액인 Fluo-4를 배지와 섞어 각각의 well에 넣고 30~40분 동안 37℃에서 배양한다. 배양이 끝나면 覆盆子 1, 50μg/ml 농도로 세포에 1~2시간 처리한 후 ionophore를 5분 동안 반응시키고 형광광도계를 이용하여 여기파장 360nm/방출파장 565nm에서 3분당 6번을 읽어 측정한다.

## 6) 혈관내피세포에서 ROS 소거능 측정

YPEN 세포를 96-well에 심은 후 하루 동안 배양한 다음 1, 10, 50μg/ml의 覆盆子和 t-BHP 20μM을 처리하여 1시간 배양한다. 각각의 well에 10μM DCFDA를 가하여 세포내 생성된 ROS에 대한 覆盆子の 소거능을 형광광도계를 이용하여 여기파장 360nm/방출파장 565nm에서 측정하였다.

## 7) 혈관내피세포에서 ROS 소거능의 현미경적 분석

YPEN 세포를 6-well plates에 2×10<sup>4</sup>cells/ml로 심은 후 하루 동안 배양한 다음 1, 10, 50μg/ml의 覆盆子和 t-BHP 20μM을 처리하여 1시간 배양한다. 배지를 버리고 각각의 well에 10μM DCFDA를 가하여 세포내 생성된 ROS에 대한 覆盆子の 소거능을 형광현미경(Axiovert 100, Zeiss, Germany)을 통해 분석하였다.

## 8) Propidium iodide(PI) 염색

세포를 1% BSA가 함유된 PBS(PBS-B)로 2회 세척 후, 0.5% Tween-20이 포함된 70% ethanol로 4℃에서 30분간 고정시킨다. PBS-B로 세포를 세척한 후, propidium iodide 용액을 최종 농도 50μg/ml 이 되도록 첨가하고 실온에서 30분간 반응 후, PBS-B로 세척하고 형광현미경 하에서 관찰한다.

9) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

III. 成 績

1. 총 ROS 제거 활성

LPS 처리된 마우스의 신장 homogenate를 사용하여 총 ROS의 소거능을 조사하였다. LPS를 처리하

면 대식세포가 활성화되고, 따라서 NADPHO<sub>x</sub>, COX, XOD와 같은 효소로 하여금 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH과 같은 ROS 생성을 유도하게 된다. 覆盆子 추출물 1, 10, 50µg/ml 농도에서 각각 0.31, 19, 57%의 제거 활성을 나타내어 ROS에 대한 강한 소거 활성을 나타내었다(Fig. 1).

2. SIN-1에 의해 생성되는 ROS 제거 활성

SIN-1에 의해 생성되는 ROS 제거능을 검토한 결과, 覆盆子추출물 0.8, 8, 40 µg/ml 농도에서 각각

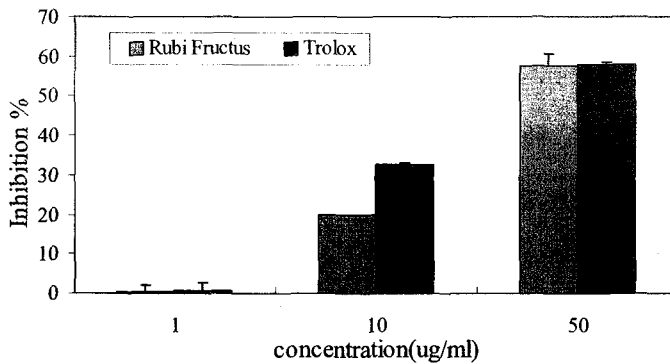


Fig. 1. ROS scavenging activity of *Rubi Fructus* in LPS-treated mouse kidney homogenate.

The mice were pretreated with intraperitoneal injection of 5mg/kg and 24h later decapitated. The kidney was isolated and homogenized with phosphate buffer. The homogenate was incubated without or with active components. ROS scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DCFDA. Each value is the mean ± S.D. of triplicate measurements.

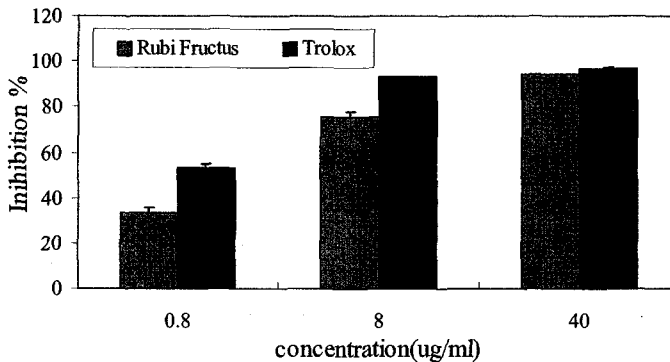


Fig. 2. Effect of *Rubi Fructus* on SIN-1-derived ROS generation.

Each value is the mean ± S.D. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by SIN-1(100µM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

33, 75, 94% 제거 활성을 나타내어 기존 ROS 제거제인 trolox(1, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )보다는 약하지만, 비교적 강한 ROS 제거 활성을 나타내었다(Fig. 2).

### 3. *t*-BHP에 의해 생성되는 ROS 제거 활성

覆盆子の 과산화물 유래 ROS 제거 활성을 검토하기 위하여 *t*-BHP에 의해 생성되는 ROS 제거능을 검토한 결과, 覆盆子추출물 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각 23, 50, 79% 제거 활성을 나타내어 기존 ROS 제거제인 trolox(1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )보다는 약하지만,

ROS 제거 활성을 어느 정도 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 3).

### 4. ONOO<sup>-</sup> 제거 활성

覆盆子が ONOO<sup>-</sup> 자체를 직접 제거하는 활성을 나타내는지 검토한 결과, 覆盆子추출물 1, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각 20, 80, 97%의 제거 활성을 나타내어 ONOO<sup>-</sup> 제거제로 잘 알려져 있는 penicillamine(1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )보다 약하지만 비교적 강한 ONOO<sup>-</sup> 제거 활성을 나타내었다(Fig. 4).

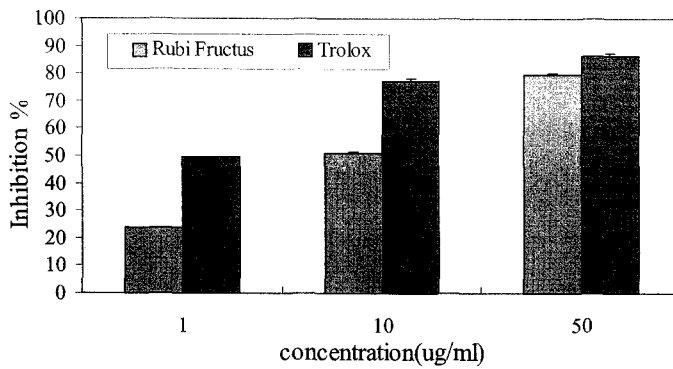


Fig. 3. Effect of *Rubi Fructus* on *t*-BHP-derived ROS generation.

Each value is the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by *t*-BHP(10 $\mu\text{M}$ ) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

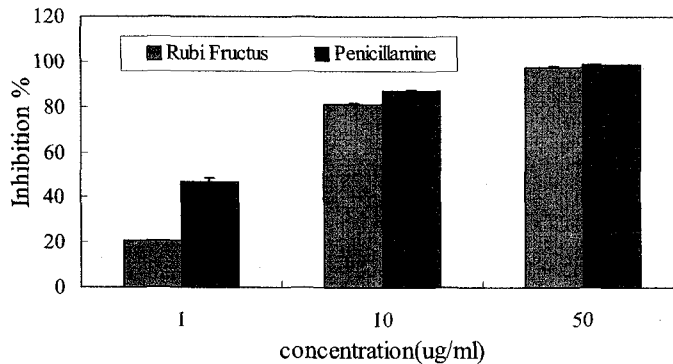


Fig. 4. ONOO<sup>-</sup> scavenging activity of *Rubi Fructus*

Each value is the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by authentic ONOO<sup>-</sup>(10 $\mu\text{M}$ ) was measured with the change of fluorescence.

5. SIN-1에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup> 생성 저해 활성

SIN-1에 의해 생성되는 NO와 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 상호작용에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup> 생성 억제 작용을 검토해 본 결과, 覆盆子추출물 1, 10, 50µg/ml 농도에서 각각 64, 93, 97% 억제 활성을 나타내어 ONOO<sup>-</sup> 생성 억제 활성도 관찰되었다(Fig. 5).

6. 세포내 칼슘 농도에 대한 효과

Ionophore를 혈관내피세포에 처리하여 세포내 칼슘 농도를 직접적으로 증가시켜준 뒤 覆盆子를 처리한 결과, ionophore에 의해 증가된 세포내 칼슘 농도를 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 6).

7. 혈관내피세포의 ROS 생성에 대한 효과

혈관내피세포에서 ROS 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 t-BHP 20µM로 ROS 생성을 유도한 혈관내피세포에 覆盆子를 처리하여 ROS 생성이 억제되는지를 분석하였다. t-BHP를 처리하여 ROS 생성이 현저히 증가되었으나, 覆盆子추출물 1, 10, 50 µg/ml를 처리한 것은 농도 의존적으로 ROS 생성이 현저히 감소되었다(Fig. 7).

8. 혈관내피세포에서 t-BHP에 의해 유도된 ROS 생성에 대한 현미경 분석

t-BHP 20µM로 ROS 생성을 유도한 혈관내피

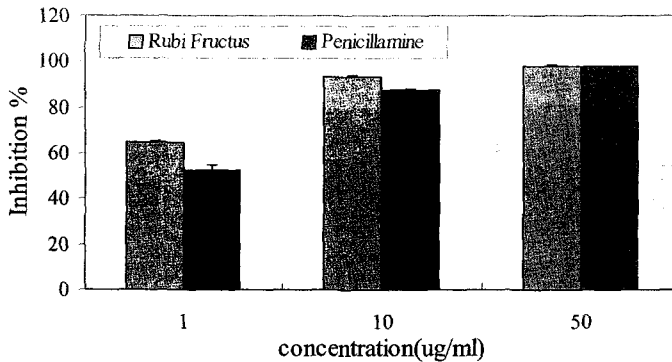


Fig. 5. Effect of *Rubi Fructus* on SIN-1-derived ONOO<sup>-</sup> generation.

Each value is the mean ± S.D. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by SIN-1(100µM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

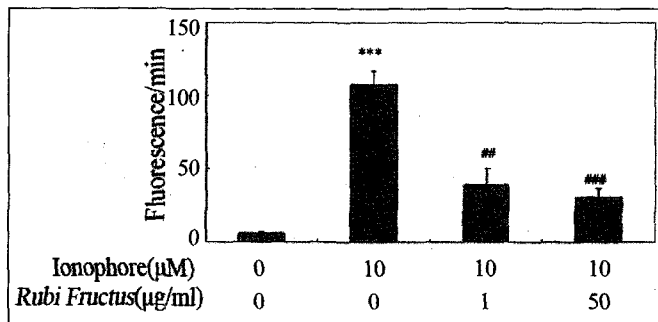


Fig. 6. Inhibitory effect of *Rubi Fructus* on intracellular Ca<sup>2+</sup> level.

YPEN cells were grown to confluency 80% in 96 well in DMEM medium. Cells were treated with ionophore in the absence or presence of *Rubi Fructus*. Ca<sup>2+</sup> level was measured by Fluo-4. Each value is the mean ± S.D. of three experiments. Statistical significance: \*\*\*p<0.001 compared to non-treated, ##p<0.01, ###p<0.001 compared to treated ionophore.

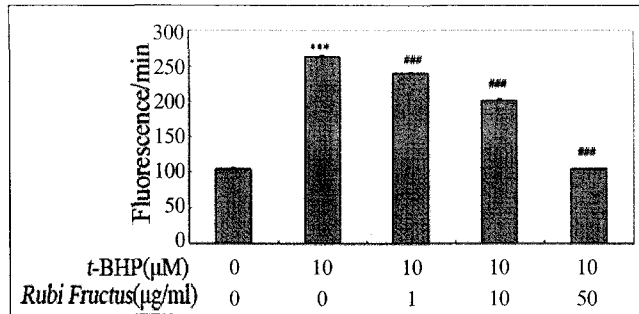


Fig. 7. Effect of *Rubi Fructus* on intracellular ROS level induced t-BHP.

Cells were pre-treated with various concentration of *Rubi Fructus* for 1h and further treated with t-BHP(20μM) for 30 min. Detection of intracellular ROS by staining with fluoremeter using DCFDA. Each value is the mean ± S.D. Statistical results of one-factor ANOVA: \*\*\*p<0.001 compared to not treated t-BHP, ###p<0.001 compared to treated t-BHP.

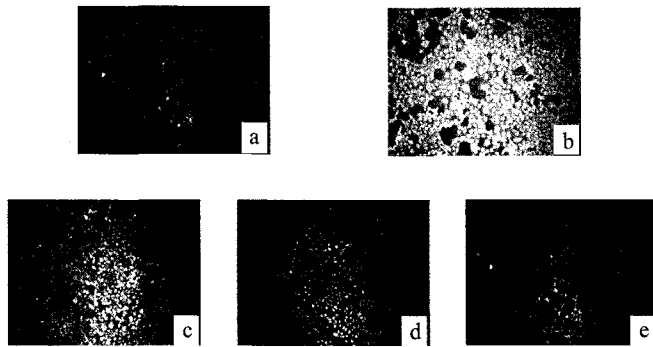


Fig. 8. Effect of *Rubi Fructus* on intracellular ROS level induced t-BHP.

Cells were pre-treated with various concentrations of *Rubi Fructus* for 1 h and further treated with t-BHP(20μM) for 30 min. The level of intracellular ROS were detected by DCFDA using fluorescence microscope. a: untreated control, b: 20μM t-BHP alone, c: 20μM t-BHP and 1μg/ml *Rubi Fructus*, d: 20μM t-BHP and 10μg/ml *Rubi Fructus*, e: 20μM t-BHP and 50μg/ml *Rubi Fructus*.

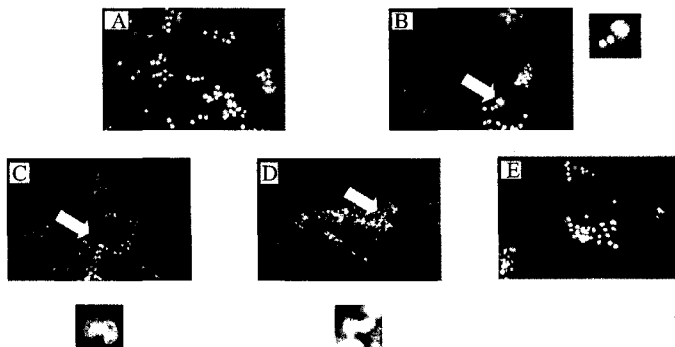


Fig. 9. Effect of *Rubi Fructus* on apoptosis induced t-BHP.

Detection of apoptotic morphology by staining with fluorescent DNA-binding dye, P.I. Cell were treated *Rubi Fructus*. After 1 h, cells were treated with t-BHP for 4h and were observed P.I. staining. A: untreated control, B: 10 M t-BHP treated alone, C: 10M t-BHP and *Rubi Fructus* 1μg/ml, D: 10M t-BHP and *Rubi Fructus* 10μg/ml, E: 10M t-BHP and *Rubi Fructus* 50μg/ml.

세포에 覆盆子를 처리하여 ROS 생성을 억제되는가를 형광 현미경으로 분석하였다. *t*-BHP 처리에 의해 ROS 생성이 현저히 증가되었으나, 覆盆子추출물 1, 10, 50 $\mu$ g/ml를 처리한 것은 ROS 생성이 현저히 감소되었다(Fig. 8).

#### 9. 세포사 억제 작용

PI는 죽은 세포를 관찰하기 위해서 사용되어지는데, plasma membrane이 손상을 입어서 죽거나 죽어가는 세포는 PI와 반응할 수 있고 그것은 double-stranded nucleic acids로 염색된다.<sup>19</sup> 覆盆子가 세포사에 어떠한 영향을 미치는지 알아본 결과, *t*-BHP에 의해 유도된 세포사 (핵막이 깨진 상태)를 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 9).

### IV. 考 察

·O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 포함하는 ROS는 생체 내에서 지속적으로 생성되지만 적절하게 제어되지 않으면 축적되어서 단백질, 지질, 핵산 등에 손상을 야기한다<sup>13,14</sup>. 이런 ROS와 free radical들이 매개하는 반응들이 노화, 암, 심장질환, 알츠하이머 등 퇴행적이거나 병리학적인 질환들을 유발한다고 알려져 있다<sup>15-17</sup>. 생체 내에는 ROS를 제거할 수 있는 SOD, catalase, peroxidases, ascorbate, tocopherol, carotenoids 등 enzymatic, nonenzymatic antioxidant defense system을 가지고 있다<sup>3</sup>. 하지만 이 시스템은 생체 내에서 발생하는 ROS를 제어하기에는 충분치 않다.

생체 내에서 NO와 ·O<sub>2</sub>가 동시에 발생하는 조건에서 라디칼-라디칼 반응으로 쉽게 비라디칼인 ONOO<sup>-</sup>가 생성된다. 노화과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO<sup>-</sup> 생성을 더욱 증가시켜, 세포 및 조직 손상을 가져와 여러 노인성 질환을 촉진한다<sup>18</sup>.

ONOO<sup>-</sup>는 NO와 ·O<sub>2</sub>보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 미토콘드리아의 호흡억

제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이런 ONOO<sup>-</sup>의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다<sup>19-21</sup>. 생체 내에 존재하는 ROS와 ONOO<sup>-</sup>를 조절할 수 있는 항산화 효소가 부족하므로 이런 항산화 능력을 가진 천연물을 찾고 연구하는 것은 매우 중요하다.

覆盆子는 補腎藥物로서 甘酸平한 性味로 肝, 腎經에 歸經하여 補肝腎, 固精縮尿 등의 효능으로 陽痿, 遺精, 虛損, 女子無子 등의 치료에 활용되어 왔다<sup>6</sup>. 유효 성분으로 탄닌은 항암 효과가 있고 항산화 작용을 하는 폴리페놀이 다량 함유되어 노화를 방지한다. 사포닌은 콜레스테롤 대사를 촉진하며 베타시토스테롤은 강심, 이뇨, 담즙 분비를 촉진한다. 유효 성분으로는 탄수화물로 포도당, 과당, 서당, 펙틴 등을 함유하며, 유기산인 레몬산, 사과산, 살리실산, 카프론산, 개미산 등이 있다. 그 외 비타민 B와 C가 있으며, 색소 성분으로 카로틴, 폴리페놀, 안토시아닌, 염화시아닌 배당체를 함유하고 있다<sup>22</sup>. 색소 성분인 안토시아닌은 포도, 가지 같은 채소나 과일에 널리 분포하는 플라보노이드의 한 종류로, 혈중으로 급속히 흡수되어 항산화, 항돌연변이 및 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>23</sup>. 흰쥐와 사람에서 안토시아닌의 흡수와 대사를 포함한 bioavailability가 보고되어 있다. Cyanidin 3-glucoside(Cy 3-glc)를 경구투여하면 Cy 3-glc과 그것의 대사산물인 protocatechuic acid (PCA)가 흰쥐 혈중에서 나타난다<sup>24,25</sup>. 아실화된 안토시아닌도 흡수되면 흰쥐와 사람에게서 소화 후에 어느 한 부분에서 나타난다<sup>26</sup>.

覆盆子の ROS 제거능을 ROS와 특이하게 반응하여 형광을 내는 DCFDA를 이용하여 측정한 결과, 覆盆子추출물이 신장의 균질액에서 LPS로 생성을 유도한 ROS를 강력하게 제거하였을 뿐만 아니라, SIN-1, *t*-BHP에 의해 생성되는 ROS도 강력하게 제거하는 활성이 관찰되었다. ROS 및 독성이 강한



ONOO<sup>-</sup> 자체 그리고 SIN-1에 의해 생성된 ONOO<sup>-</sup>도 강력하게 제거하였다. 따라서 覆盆子는 ROS 뿐만 아니라 ONOO<sup>-</sup>을 제거하는 능력을 가지고 있으므로 생체 내에 ROS 및 ONOO<sup>-</sup> 축적을 억제할 것으로 사료된다.

생체 내에서 일어나는 거의 모든 현상들은 혈관을 거쳐 발생하므로 혈관 내피세포에서 覆盆子が t-BHP에 의해 생성되는 ROS 억제능이 있는지를 형광광도계와 형광현미경을 통해 관찰한 결과 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다.

또한 覆盆子が ROS를 발생시키는 생체내 칼슘 농도에 미치는 영향을 살펴본 결과 ionophore로 자극되어 칼슘 농도가 증가한 혈관내피세포에서 覆盆子추출물이 농도 의존적으로 칼슘 농도를 저해하는 것으로 나타났다. 실험에 사용한 ionophore는 직접적으로 생체 내 칼슘 농도를 증가시키는 물질로 알려져 있다<sup>27</sup>. Annunziato<sup>28</sup> 등의 최근 보고에 의하면, t-BHP에 의한 산화스트레스는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가와 더불어 caspase-2, -3을 활성화시킴으로써 세포사를 일으키는 것으로 보고되었다. 또한 세포사 과정 동안 DNA가 응축되는 형태 변화와 함께, DNA 단편화가 나타나며 이러한 DNA의 변화는 세포사의 지표로 이용되고 있다<sup>29</sup>.

그리고 PI staining을 통하여 覆盆子が t-BHP에 의해 유도된 세포사에 미치는 영향을 확인한 결과 농도 의존적으로 세포사를 억제하였다. PI는 죽은 세포를 관찰하기 위해서 사용되어지는데, plasma membrane이 손상을 입어서 죽거나 죽어가는 세포는 PI와 반응할 수 있고 그것은 double-stranded nucleic acids로 염색된다<sup>30</sup>. 覆盆子를 전처리한 혈관 내피세포에서 t-BHP에 의한 DNA의 형태 변화를 억제함으로써 산화 스트레스에 의한 세포사로부터 세포를 보호할 것으로 사료되었다.

이상의 실험 결과로 覆盆子는 ROS와 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 효과를 나타내고, 세포 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가 억제를 통하여 세포사도 억제하여 노화 과정 및 노인성 질환을 조절하는데 유효한 약제가 될 가능성을 시사해 준다. 아울러 覆盆子の 구성 성분들이 항

산화 효과를 나타내어 활성에 주된 역할을 하리라 추측된다.

## V. 結 論

노화 과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 ROS와 ONOO<sup>-</sup>에 대한 覆盆子の 제거능을 검토하였다. 覆盆子는 ROS를 농도 의존적으로 소거하였고 SIN-1, t-BHP에 의해 생성되는 ROS도 효과적으로 소거하였다. 覆盆子는 ONOO<sup>-</sup>를 농도 의존적으로 소거하였고, SIN-1에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup>도 효과적으로 소거하였다. 覆盆子는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 증가를 효과적으로 억제하였고, 혈관내피세포 배양계에서 t-BHP에 의한 ROS 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며 t-BHP에 의한 세포사로부터 세포를 보호하는 효과를 나타내었다. 이상의 결과로서 覆盆子는 ROS와 ONOO<sup>-</sup>를 효과적으로 소거하고 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가를 억제하여 세포를 보호함으로써 노화 및 노인성 질환에 유용한 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

## 參考文獻

1. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:651-68.
2. Kashiwagi K, Shinkai T, Kajii E, Kashiwagi A. The effects of reactive oxygen species on amphibian aging. *Comp Biochem Physiol C.* 2005;140:197-205
3. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;232:164-70.
4. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003;189:41-54
5. Jackson MJ. Handbook of oxidants and antio-

- oxidants in exercise. Elsevier: Amsterdam; 1999, p.57-68.
6. 김호철 외. 覆盆子類의 效能에 관한 비교 연구. 본초분과학회지. 1991;6(1):7.
  7. 손현주, 정지천. 覆盆子추출물이 Ethanol에 의한 만성 알코올 중독 흰쥐의 음경해면체내 nitric oxide synthase 활성과 nitrite 함량에 미치는 영향. 한의정보학회지. 2000;6(1):46-56.
  8. 이선희, 이병철. 抗癌 및 免疫효과에 覆盆子藥 鍼이 미치는 영향. 대한침구학회지. 2000;17(1): 189-219.
  9. 손종수. 覆盆子藥 鍼의 抗酸化作用에 관한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 석사학위 논문. 1999.
  10. 김형준, 정지천. 五子丸의 Peroxynitrite 제거 작용. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):107-18.
  11. Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem* 1983;134:111-6.
  12. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun*. 1994;16:149-56.
  13. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90: 7915-22.
  14. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;2:298-300.
  15. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative disease. *Science*. 1983;221:1256-64.
  16. Harman D. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs and Aging*. 1993;3:60-80.
  17. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*. 2000; 408:239-47.
  18. Namba T. The encyclopedia of Wakan-Yaku. Hoikusha, Tokyo. 1993;1:222-3.
  19. Haenen GPM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236: 591-6.
  20. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232:164-70.
  21. Chung HY, Kim HJ and Kim JW. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann NY Acad Sci*. 2001; 928:327-35.
  22. 박종희. 한약백과도감(상). 신일상사, 2002, pp. 230.
  23. Galvano F, Fauci LL, Lazzarino G, fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, Battistini NC, Tavazzi B, Galvano G. Cyanidins: metabolism and biological properties. *J Nutr Biochem*. 2004;15: 2-11.
  24. Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem*. 1999;47:1083-91.
  25. Tsuda T, Horio F, Osawa T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-β-D-glucoside in rats. *FEBS Lett*. 1999;449:179-82.
  26. Harada K, Kano M, Takayanagi T, Yamakawa O, Ishikawa F. Absorption of acylated anthocyanins in rats and humans after ingesting an extract of *Ipomoea batatas* purple sweet potato tuber. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68: 1500-7.
  27. Przygodzki T, Sokal A, Bryszewska M. Calcium ionophore A23187 action on cardiac

- myocytes is accompanied by enhanced production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1740:481-8.
28. Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, Sirabella R, Secondo A, Sibaud L, Di Renzo GF. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett*. 2003;139:125-33.
29. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, Isaacs WB, Nelson WG. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*. 2003;62(Suppl 1):55-62.
30. Haugland. Handbook of fluorescent probes and research Chemicals, Molecular Probes, Eugene, OR. 1992.