

숙지황 에탄올 추출물이 HEI-OC1 세포의 항산화 효소 활성화에 미치는 영향

유현희 · 김연화¹ · 정수영² · 신미경² · 박래길³ · 소홍섭³ · 전병훈⁴ · 유용욱^{1*}

군산대학교 식품영양학과, 1: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실 · VCRC,
2: 원광대학교 식품영양학과, 3: 원광대학교 의과대학 미생물학과 · VCRC,
4: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of the Ethanol Extract from Steamed Roots of *Rehmannia Glutinosa* on the Antioxidant Enzyme Activities in HEI-OC1 Auditory Cells

Hyeon Hee Yu, Yeon Hwa Kim¹, Su Young Jung², Mee Kyung Shin², Rae Kil Park³, Hong Seob So³,
Byung Hun Jeon⁴, Yong Ouk You^{1*}

Department of Food and Nutrition, Kunsan National University,

1: Department of Oral Biochemistry & Vestibulocochlear Research Center, School of Dentistry, Wonkwang University,

2: Department of Food and Nutrition, Wonkwang University,

3: Department of Microbiology & Vestibulocochlear Research Center, School of Medicine, Wonkwang University,

4: Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

A mechanism of hair cell damage caused by noise and ototoxic agents is mediated through generation of free radicals and reactive oxygen species (ROS). It is known that most of animals have defense systems to protect against ROS, and the cochlea of inner ear in animals also has ROS defense systems including several antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), and glutathione (GSH), which efficiently detoxifying ROS generated under normal condition. Steamed roots of *Rehmannia glutinosa* have been traditionally used in Oriental medicine for the treatment of auditory disease such as tinnitus, vertigo, and hearing loss as well as inflammatory diseases, hectic fever, night sweat, and headache. In the present study, we showed that the ethanol extract from steamed roots of *R. glutinosa* (ESRG) increased the antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GPX, and GR activities and GSH level in HEI-OC1 auditory cells. This extract itself did not show any significant cytotoxicity up to 50 µg/ml. Our results further support the view that ESRG is promising sources of potential antioxidants. Future studies will be aimed at investigating the effects of ESRG on the regulation of cellular mechanisms and isolating and identifying the substances responsible for the regulation of antioxidant enzyme system from the plant extracts.

Key words : *Rehmannia glutinosa*, HEI-OC1 cell, antioxidant enzyme, glutathione

서 론

인간에게 중요한 오감중의 하나인 청각은 아주 큰 소음 또

는 약물부작용에 의한 독성에 의해 이명, 난청, 청력소실 등의 심각한 장애를 일으킨다¹⁻³⁾. 소음이나 약물 독성에 의한 와우 미토콘드리아 내에서의 과도한 대사가 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 발생을 촉진함으로써 와우(cochlea) 유모세포의 손상을 증가시키는 것으로 보고 되고 있다³⁻⁶⁾.

ROS는 superoxide radical (O₂⁻), hydroxy radical (OH⁻),

* 교신저자 : 유용욱, 익산시 신용동 원광대학교 치과대학 구강생화학교실

· E-mail : hope7788@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6926

· 접수 : 2005/08/11 · 수정 : 2005/12/05 · 채택 : 2005/12/14

peroxyl radical (HO_2^{\cdot}), nitric oxide radical (NO^{\cdot})과 같은 유리라디칼과 라디칼형태가 아닌 singlet oxygen (1O_2), 오존(O_3), hypochlorous acid (HOCl) 그리고 H_2O_2 등이 있다^{7,9}). 이러한 ROS의 축적이 주로 세포내 지질의 과산화, DNA와 단백질의 산화를 일으켜 조직손상과 함께 청력감소와 같은 퇴행성신경질환, 면역결핍증, 동맥경화, 심장병, 고혈압, 당뇨병, AIDS 그리고 암 등에 있어서 병리적 요인으로 밝혀지고 있다^{7,10}). 정상적인 생리적 조건하에서 세포 대사 동안에는 ROS의 수준과 내인성 항산화물의 균형이 유지되어 산화적 손상으로부터 조직을 보호한다. 생체 내의 ROS의 발생을 억제하여 불활성 시키거나 이미 생성된 유리라디칼을 제거하기위한 내인성 항산화기전으로는 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathion reductase (GR) 등과 같은 항산화 효소계와 glutathione, ascorbic acid, sulfhydryl groups, Vitamine A, Vitamin E 등과 같은 비효소계인 항산화물질 등이 있다¹¹). 항산화 효소들은 세포막의 지질 과산화 손상, sulfhydryl-함유 효소의 불활성화, 구성 단백질의 교차결합 등을 일으키는 ROS를 불활성화 시키거나 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다¹²). 특히, SOD는 세포내 호흡작용의 부산물로서 생성되는 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키며¹³) 이렇게 생성된 H_2O_2 를 CAT와 peroxidase가 물로 전환시킨다^{14,15}). GPX는 peroxidase 일종으로 H_2O_2 를 소거하면서 H_2O_2 와 환원형 glutathione (GSH)과 반응하여 산화형 glutathione (GSSG)을 생성하고 이 GSSG는 GR의 도움으로 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원된다¹⁶).

숙지황은 지황 (*R. glutinosa* Liboschitz)의 뿌리를 황주 또는 백주에 넣고 주침(酒浸)한 후 증숙(蒸熟)하여 건조를 반복한 것으로, 본초강목, 동의보감에서는 청력을 좋게 하며^{17,18}) 한국본초도감에는 이명(耳鳴)이 있을 때 쓴다¹⁹)고 기록되어 있다. 또한 보음(補陰), 보혈(補血), 월경불조(月經不調), 빈혈(貧血), 두통(頭痛), 하복통(下腹痛) 등의 병증의 치료에도 사용된다²⁰). 숙지황 추출물의 관련된 연구를 보면 항산화 효과^{21,22}), 항돌연변이 효과²³), 간암세포 및 폐암세포주에 대한 성장저해 효과²⁴), 혈당 강하 효과²⁵)가 있음을 보고되어 있다. 그러나 아직까지 숙지황의 이명 치료 기전에 대한 연구결과는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 숙지황 에탄올 추출물이 청각 세포주 (auditory cell line)인 HEI-OC1 세포에 대한 항산화효소의 활성에 미치는 효과를 검색하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 숙지황 에탄올 추출물 준비

숙지황은 서울 경동시장에서 국내산을 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 잘게 부순 숙지황 100 g을 2 L의 에탄올에 72시간 냉침 후 여과지(Watman No. 1)에 거른 후, 감압 농축하여 냉동 건조시킨 후 -20 °C에 보관하면서 실험에 준비하였다.

2. 세포 배양

형질변환 쥐 (Immortomouse™, Charles River Laboratories,

USA)의 와우로부터 분리 배양한 HEI-OC1 세포를⁶) Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)과 50 U/ml gamma-interferon ($INF-\gamma$, R&D System, USA)이 첨가된 배양액에 부유한 후 5% CO_2 , 33 °C 배양기에서 배양한 후, 2일마다 새로운 배양액으로 교환해 주었다. 시료 처리군의 효소 활성도 및 GSH 함량 측정 실험에서는 숙지황 에탄올 추출물 0, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$, resveratrol 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 실험 3시간 전에 먼저 처리하였다. 3시간 후 배양액과 세포를 모아 원심분리 (3000 X g, 6분)하여 상청액을 제거한 후 남은 cell pallet에 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)를 넣고 다시 원심분리 (3000 X g, 6분)한 후 상청액을 제거하였다. 남은 cell pallet에 PBS (pH 7.4)를 1 ml 넣어 초음파로 분쇄한 후 원심분리 (4000 X g, 10분)하여 상청액을 -80 °C에 보관하면서 효소실험을 위한 cell lysates로 사용하였다.

3. Superoxide dismutase (SOD)와 Catalase (CAT) 활성도 측정

SOD의 활성도는 SOD assay Kit (Dojindo Molecular Technologies Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다²⁶). 흡광도는 microplate reader (Spectra Max 250, Molecular Devices Co.)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 효소의 활성도는 bovine erythrocyte SOD (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.)의 표준 검량곡선에 준하여 계산한 후 단백질 1 mg 당 Unit로 표시하였다 (Unit/mg protein).

CAT의 활성도는 Carrillo 등²⁷)의 방법을 적용하였다. 50 mM의 PBS (pH 7.0)에 3% H_2O_2 12 μl 과 cell lysates 100 μl 을 가하여 최종적으로 1.0 ml가 되도록 하여 37 °C에서 2분간 처리한 후 240 nm에서 5분간 흡광도 변화를 측정한 후 1분 동안 소거된 H_2O_2 μmole 을 1 Unit로 하여 단백질 1 mg 당 Unit로 표시하였다 (Unit/mg protein).

4. Glutathione peroxidase (GPX)와 Glutathione reductase (GR) 활성도 측정

GPX의 활성도는 Flohe와 Gunzler²⁸)의 방법에 의하여 측정하였다. Cell lysates 10 μl 에 100 mM PBS (pH 7.2) 200 μl 와 2.4 U/ml GR, 10 mM GSH, 3 mM NADPH를 각각 10 μl 씩 첨가하였다. 최종적으로 12 mM cumene hydroperoxide를 10 μl 첨가하여 반응을 개시한 후 37 °C에서 5분 동안 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 GPX 활성도는 단백질 1 mg 당 1분 동안 소비된 NADPH nmole로 표시하였다 (nmole NADPH consumed/min/mg protein).

GR의 활성도는 Carlberg와 Mannervik²⁹)의 방법에 의하여 측정하였다. 0.1 M PBS (pH 7.6) 1.65 ml, 0.5 mM EDTA 0.1 ml, 1 mM 산화형 glutathione (GSSG) 0.05 ml, 0.1 mM NADPH 0.1 ml 그리고 cell lysates 0.1 ml를 가하여 반응혼합액을 2 ml로 만들어 37 °C에서 반응시킨 후, 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 활성도는 단백질 1 mg 당 1분 동안 산화된 NADPH nmole로 표시하였다 (nmole NADPH oxidized/min/mg protein).

5. GSH 함량의 측정

GSH는 Jollow 등³⁰⁾의 방법에 의하여 측정하였다. Cell lysates와 4% sulfosalicylic acid를 동량으로 혼합한 후 1시간 동안 4 °C에서 예치하였다. 그리고 1200 X g에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액 0.05 ml를 취하여 100 mM DTNB 0.1 ml, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 1.35 ml를 가하여 분석액 1.5 ml로 만들었다. 방치 후 노란색이 발색되는 즉시 분광광도계로 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 단백질 1 mg 당 µg으로 표시하였다 (µg/mg protein).

6. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay

숙지황 에탄올 추출물의 HEI-OC1 세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA) assay^{31,32)}에 의하여 측정하였다. 숙지황 에탄올 추출물을 0, 5, 10, 50 µg/ml의 농도별로 각각 세포에 처리하여, 24시간동안 배양한 후, MTT 100 µg/ml을 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 37 °C 배양기에서 반응시켰다. 각 well의 상층액을 추출한 후, 각 well에 200 µl의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성은 대조군에 대한 백분율로 산출하였다.

7. 단백질 함량 측정

Lowry 등³³⁾의 방법에 의하여 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co.)을 표준용액으로 사용하여 측정하였다.

8. 통계분석

실험은 모두 3회 반복하였으며, 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS (ver 10.0)를 사용하여, 평균과 표준오차로 제시하였으며, α=0.05 수준에서 실험군과 대조군의 평균치에 대하여 Student's t-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. SOD와 CAT 활성도

Table 1은 숙지황 에탄올 추출물 (5-50 µg/ml)이 HEI-OC1 세포의 SOD와 CAT의 활성도에 미치는 영향을 나타내었다. 숙지황 에탄올 추출물 (5-50 µg/ml)을 처리한 군은 대조군에 비해 유의하게 SOD와 CAT 모두 활성도가 증가하였다 (p<0.05). 특히 SOD에 대해 숙지황 10 µg/ml 처리군에서 대조군에 비해 활성도가 2배 이상 증가하였다. 양성대조군인 resveratrol 10 µg/ml 처리군은 대조군에 비해 유의적인 차이가 없었으며, 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml 처리군보다 더 낮은 활성도를 나타내었다. CAT는 숙지황 에탄올 추출물 5-50 µg/ml을 처리한 군에서 대조군에 비하여 CAT의 활성도가 유의적으로 증가하였으며 (p<0.05), 10 µg/ml을 처리한 군이 가장 높은 활성도를 나타내었다. Resveratrol 10 µg/ml 처리군도 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml 처리군에 비하면 약간 낮은 활성도를 나타내었다.

Table 1. Effect of the ethanol extract from steamed roots of *Rehmannia glutinosa* (ESRG) on SOD and CAT activity in HEI-OC1 cells.

Sample Concentration (µg/ml)	SOD (Unit/mg protein)	CAT (Unit/mg protein)
0	11.66±1.38	108.31±2.23
ESRG 5	21.23±3.62*	146.33±3.40*
10	25.55±1.20*	160.00±6.67*
50	24.01±1.46*	154.24±1.78*
Resveratrol 10	14.43±1.61	143.00±3.95*

Cells were treated with ESGR for 3 h and SOD activity was measured at 450 nm and CAT activity was measured at 240 nm. Data are mean±S.E. in triplicate. * p<0.05 when compared with control group.

2. GPX와 GR 활성도

Table 2에 숙지황 에탄올 추출물이 HEI-OC1 세포의 GPX와 GR 활성도에 미치는 영향을 나타내었다. 숙지황 에탄올 추출물 (5-50 µg/ml)은 농도 의존적으로 대조군에 비교하여 유의한 수준의 GPX의 활성도를 나타내었다 (p<0.05). 특히 숙지황 에탄올 추출물 50 µg/ml 처리군은 대조군에 비해 GPX 활성도가 5배 이상 증가하였다. 그리고 resveratrol 10 µg/ml 처리군도 대조군에 비해 GPX 활성도가 유의적으로 증가하였으며, 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml 처리군보다 약간 높은 활성도를 나타내었다. GR 활성도는 숙지황 에탄올 추출물 5, 10 µg/ml 처리군은 대조군에 비하여 유의적인 차이가 없었으나 50 µg/ml 처리군은 유의적으로 증가하였다 (p<0.05). Resveratrol 10 µg/ml 처리군은 GR 활성도가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml 처리군 보다 활성도가 높았다.

Table 2. Effect of the ethanol extract from steamed roots of *Rehmannia glutinosa* (ESRG) on GPX and GR activity in HEI-OC1 cells.

Sample Concentration (µg/ml)	GPX (nmol NADPH consumed/min/mg protein)	GR (nmol NADPH oxidized/min/mg protein)
0	54.82±5.09	40.20±0.18
ESRG 5	71.38±2.60*	40.10±0.34
10	107.51±1.78*	41.56±0.80
50	307.33±7.54*	48.93±0.69*
Resveratrol 10	122.25±2.18*	44.11±0.55*

Cells were treated with ESGR for 3 h and GPX and GR activity was measured at 340 nm. Data are mean±S.E. in triplicate. * p<0.05 when compared with control group.

3. GSH 함량

숙지황 에탄올 추출물 5, 10 µg/ml 처리군은 GSH 함량이 대조군에 비하여 유의적인 차이가 없었으나, 50 µg/ml 처리군은 대조군에 비해 약 1.5배 증가하여 유의적인 차이를 보였다 (p<0.05). Resveratrol 10 µg/ml 처리군은 대조군에 비해 GSH 함량이 유의적인 차이가 없었으며, 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml 처리군과 유사한 수준이었다 (Fig. 1).

4. 숙지황 에탄올 추출물의 HEI-OC1 세포에 대한 세포독성

숙지황 에탄올 추출물의 HEI-OC1 세포에 대한 직접적인 독성작용을 MTT 방법으로 알아보았다. 숙지황 에탄올 추출물 5, 10, 50 µg/ml을 24시간 동안 처리한 결과 세포독성이 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

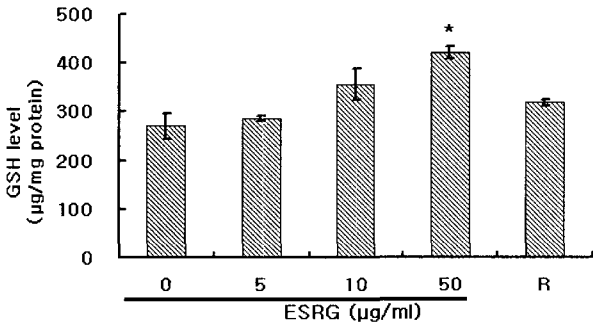


Fig. 1. Effect of the ethanol extract from steamed roots of *Rehmannia glutinosa* (ESRG) on GSH level in HEI-OC1 cells. Cells were treated with ESRG for 3 h and GSH activity was measured at 412 nm. Data are mean±S.E. in triplicate. * p<0.05 when compared with control group. R : Resveratrol 10 µg/ml.

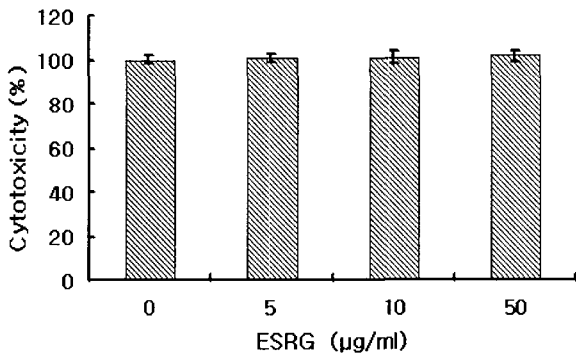


Fig. 2. Cytotoxic effect of the ethanol extract from steamed roots of *Rehmannia glutinosa* (ESRG) on HEI-OC1 cells. MTT assay was performed after 1 day incubation. Data are mean±S.E. in triplicate.

고찰

ROS는 신체 내의 에너지 생성과정, 정상적인 신진대사 과정 및 면역체계를 통해서도 끊임없이 생성되며, 화학적으로 매우 반응성이 높고 불안정하며 세포독성이 있는 물질이다⁸⁾. 특히 소음성 난청, 와우허혈에 의한 돌발성 난청, 아미노글라이코사이드 항생제의 이독성에 ROS가 관련되어 있음이 보고 되고 있다^{3,6)}. 정상적인 상태의 세포는 ROS를 제거하는 항산화 시스템에 의해 항상성을 유지하지만, 제거체계의 능력을 넘어 과생산 되거나 항산화 방어 기전의 활성이 감소하는 경우 여러 가지 기전을 통하여 이 ROS에 의한 세포와 조직의 손상이 초래 된다^{8,10)}. 즉, 항산화 시스템에 의한 ROS 방어 기전은 생물체의 생존에 대단히 중요한 역할을 수행한다. ROS의 불활성 및 제거작용은 산화방어 시스템을 구성하는 효소 시스템과 비효소적인 시스템에 의하여 이루어진다. 효소 시스템은 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), 및 glutathione 생

성 효소 시스템 등이 알려져 있다^{7,24)}. 항산화 효소는 세포막의 지질 과산화 손상, sulfhydryl-함유 효소의 불활성화, 및 구성 단백질의 교차결합 등을 일으키는 ROS를 불활성화 시키거나 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다¹²⁾.

지황은 현삼과 (Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초목의 뿌리로, 채취한 그대로의 생품을 생지황 또는 선지황이라 하고 외피를 벗겨서 건조한 것을 건지황, 생지황을 증숙한 것을 숙지황이라 하며 그 약성을 각각 다르게 사용하고 있다²⁴⁾. 숙지황은 성미(性味)가 따뜻하며 자음보혈(滋陰補血)의 효능이 있어 본초강목, 동의보감, 한국본초도감에 청력을 좋게 하며 이명이청(耳鳴耳聽)이 있을 때 쓰인다¹⁷⁻¹⁹⁾고 기록되어 있으며, 월경불조(月經不調), 빈혈(貧血), 두통(頭痛), 하복통(下腹痛), 도한(盜汗), 목현(目眩) 등의 병증의 치료에도 사용한다.

본 연구에서 숙지황 에탄올 추출물이 HEI-OC1 세포에서 ROS 제거와 관련 있는 항산화효소 SOD, CAT, GPX, GR의 활성도를 증가시킴을 관찰할 수 있었다.

SOD는 세포내 호흡작용의 부산물로서 생성되는 superoxide anion에 작용하는 첫 번째 효소로서 H₂O₂로 전환시켜 세포내 superoxide anion의 농도를 줄여준다¹³⁾. H₂O₂는 superoxide anion 보다 독성이 약하며 CAT와 peroxidase에 의해서 매우 빠르게 무독성의 H₂O로 전환된다^{11,14,15)}. Table 1의 본 연구결과, SOD가 HEI-OC1 세포에 대하여 숙지황 에탄올 추출물 처리군 (5-50 µg/ml)에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타냈으며 (p<0.05), CAT 또한 숙지황 에탄올 추출물 처리 시 (5-50 µg/ml) 대조군에 비하여 활성이 증가하는 것으로 나타났다 (p<0.05). 이는 숙지황 에탄올 추출물이 SOD의 활성을 높여 superoxide anion을 H₂O₂로 전환시키며 이와 같이 생성된 H₂O₂에 대한 첫 번째 방어 기전으로 알려진³⁵⁾ CAT의 활성 또한 증가시켜서 생성된 H₂O₂를 H₂O로 전환하여 효과적으로 무독화시키는 효소작용에 영향을 미치는 것으로 보인다. 특히 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml 처리군에서 SOD와 CAT 각각 대조군에 비하여 2.2배, 1.5배 증가하였다.

GPX는 H₂O₂와 환원형 glutathione(GSH)과 반응하여 산화형 glutathione (GSSG)을 생성하고 이 GSSG는 GR에의 도움으로 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원된다^{16,36)}. Table 2에서 숙지황 에탄올 추출물 처리군 (5-50 µg/ml)은 농도 의존적으로 대조군에 비하여 GPX 활성도가 증가되었으며 (p<0.05), GR 활성도는 50 µg/ml 처리군에서만 대조군에 비해 유의적인 차이가 있었다. 즉, 숙지황 에탄올 추출물은 GPX 활성도를 효과적으로 증가시켜 H₂O₂를 GSH와 결합시켜 무독화시킴으로써 HEI-OC1 세포의 산화적 손상으로부터 보호 역할을 할 것으로 보여진다. 또한 GPX는 microsome에서 생성된 H₂O₂ 등의 과산화물 해독 기능에 CAT보다 더 효과적으로 작용하는 것으로 알려져 있는데¹⁶⁾, 숙지황 에탄올 추출물은 저농도 (5, 10 µg/ml)에서도 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내었으며, 50 µg/ml 처리군은 대조군보다 GPX 활성도가 5배 이상 증가하여 H₂O₂ 등의 과산화물 해독 기능에 더욱 효과적일 것으로 생각된다.

GR은 NADPH를 이용하여 GSSG를 GSH로 다시 환원하여

재생시키는 중요한 효소인데^{16,36}), 숙지황 에탄올 추출물 50 µg/ml 처리군에서 GR 활성도가 유의하게 증가하였다 (p<0.05). 이는 숙지황 에탄올 추출물 50 µg/ml 처리 시, GPX가 H₂O₂와 GSH와 반응하여 GSSG를 생성하고 GSSG는 GR의 촉매작용과 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원되는 기전에 작용하여, 효과적으로 각각 GPX, GR 효소의 활성도를 증가시켰음을 알 수 있다.

Fig. 1에서 나타내듯이 GSH는 숙지황 에탄올 추출물 50 µg/ml 처리군에서 대조군에 비하여 유의적인 GSH 함량 차이를 나타내어 GPX, GR, GSH의 일련의 항산화 기전에 관여하고 있음을 알 수 있다.

Resveratrol은 포도의 씨, 껍질 등에 주로 분포하고 있으며, phytoalexin의 일종으로 천연물에 들어있는 대표적인 항산화 물질이다³⁷). Resveratrol 10 µg/ml을 처리한 군에서 대조군에 비해 SOD 활성도는 유의적인 차이가 없었으나, CAT, GPX, GR의 활성도는 유의적으로 증가하였고, GSH 함량은 유의적인 차이가 없었다. 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml 처리군은 같은 농도의 resveratrol에 비해 CAT, GPX, GR 활성도와 GSH 함량은 비슷하였으나, SOD 활성도는 현저하게 높았다. 이에 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml은 resveratrol 10 µg/ml보다 superoxide anion 해독 능력이 더 높을 것으로 보인다.

MTT 분석을 통한 숙지황 에탄올 추출물이 HEI-OC1 세포에 미치는 독성을 조사한 결과, 숙지황 추출물 5, 10, 50 µg/ml 처리군은 모두 대조군에 비해 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다.

이상의 결과에서 보는 바와 같이 숙지황 에탄올 추출물은 HEI-OC1 세포 내에서의 항산화효소를 활성화 시켜 산화적 손상으로 부터 세포 보호 효과를 나타내게 할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 숙지황 에탄올 추출물 10 µg/ml 처리군은 SOD, CAT 활성도가 가장 높게 나타났으며, 50 µg/ml 처리군은 GPX, GR의 활성도를 현저하게 증가시키며 또한 GSH 함량을 높이는 효과를 나타내어 높은 항산화효과를 보였다.

조²¹)는 숙지황 추출물이 흰쥐의 신장세포에서 glutathion의 감소를 방지하고, 산화제인 사염화탄소, menadione과 tBHP의 lactate dehydrogenase의 유출을 감소시켰다고 보고하였다. 또한 안과 이²²)는 숙지황을 투여한 노령의 흰쥐의 간과 혈액에서 항산화 효소 수치가 높다고 하여 숙지황이 다른 세포와 동물실험에서도 항산화 효과가 있는 것으로 보고 되어 있다.

앞으로 숙지황 에탄올 추출물의 세포내 항산화효소 활성 기전을 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이며, 본 연구의 결과로 보아 숙지황 에탄올 추출물의 청각세포주인 HEI-OC1 세포의 산화적 손상을 억제하기 위한 이용 가능성을 전망해 볼 수 있다.

결 론

청각세포주인 HEI-OC1 세포의 산화적 손상을 억제하기 위한 숙지황의 효과를 조사하기 위하여 HEI-OC1 세포 배양액에 숙지황 에탄올 추출물을 5, 10, 50 µg/ml 농도로 처리한 후 항산화 효소인 SOD, CAT, GPX, GR의 활성도와 GSH 함량을 측정하

였다. 그 결과 숙지황 에탄올 추출물 (5, 10, 50 µg/ml) 처리군은 SOD, CAT 활성도가 대조군에 비하여 유의적으로 높았으며 (p<0.05), 특히 10 µg/ml 처리군에서 SOD, CAT 활성도가 가장 높게 나타났다. 숙지황 에탄올 추출물 (5-50 µg/ml) 처리군은 농도 의존적으로 대조군에 비하여 GPX 활성도가 증가되었으며, GR 활성도와 GSH 함량은 50 µg/ml 처리군에서만 대조군에 비해 유의적인 차이가 있었다 (p<0.05). 그리고 숙지황 에탄올 추출물 5, 10, 50 µg/ml 처리군은 대조군에 비해 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다. 이상의 결과, 숙지황 에탄올 추출물은 HEI-OC1 세포 내에서 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로 인해 ROS의 발생을 억제시켜 산화적 손상에 대한 방어효과가 있는 것으로 생각되며, 임상에서 적용하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 원광대학교 Vestibulocochlear Research Center (VCRC) 지원으로 수행되었음 (R13-2002-055-01003-0).

참고문헌

1. Kawamoto, K., Ishimoto, S., Minoda, R., Brough, D.E., Raphael, Y. Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci* 23(11):4395-4400, 2000.
2. Rabinowitz, P.M., Pierce, W.J. Sr., Hur, M.B., Antonucci, P.G., Powell, C., Slade, M. Antioxidant status and hearing function in noise-exposed workers. *Hear Res* 173(1-2):64-171, 2002.
3. Lopez-Gonzalez, M.A., Guerrero, J.M., Rojas, F., Delgado, F. Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res* 28(2):73-80, 2000.
4. Ford, M.S., Nie, Z., Whitworth, C., Rybak, L.P., Ramkumar, V. Up-regulation of adenosine receptor in the cochlea by cisplatin. *Hear Res* 111(1-2):143-152, 1997.
5. Ravi, R., Somani, S.M., Rybak, L.P. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* 76(6):386-394, 1995.
6. Kalinec, G.M., Webster, P., Lim, D.J., Kalinec, F. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol Neurootol* 8(4):177-189, 2003.
7. Sies, H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 91(3C):31S-38S, 1991.
8. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine, 3rd end, Oxford University Press, New York, 1998.
9. Matthew, B., Gri, S. Reactive oxygen species in immune responses. *Free Radic Biol Med* 36(12):1479-1480, 2004.

10. Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., Valente, L., Bragantini, F., Leger, B., Dabbeni-Sala, F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J Biochem* 271(18):3646-3656, 2004.
11. Mittal, A., Pathania, V., Agrawala, P.K., Prasad, J., Singh, S., Goel, H.C. Influence of *Podophyllum hexandrum* on endogenous antioxidant defence system in mice: possible role in radioprotection. *J Ethnopharmacol* 76(3):253-262, 2001.
12. Bradford, M.M. 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, 1976.
13. Fridovich, I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 264, 7761-7764, 1989.
14. Bai, J., Rodriguez, A.M., Melendez, J.A., Cederbaum, A.I., Over expression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J Bio Chem* 274, 26217-26224, 1999.
15. Tome, M.E., Baker, A.F., Powis, G., Payne, C.M., Briehl, M.M. Catalase-overexpressing thymocytes are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis and exhibit increased net tumor growth. *Cancer Res* 61, 2766-2773, 2001.
16. Meister, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269(13):9337-9400, 1994.
17. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. *중약대사전*, 정담, 서울, pp 2582-2588, 1998.
18. 허준. *동의보감편찬위원회 역. 동의보감*, 화력개발사, 서울, p 1168, 1988.
19. 안덕균. *한국본초도감*, 교학사, 서울, p 834, 2000.
20. 육창수 외. *한국본초학*, 계축문화사, 서울, p 316, 1993.
21. 조수인. 흰쥐 신장 조직 손상에 대한 숙지황의 항산화 효과. *대한본초학회지* 18(4):119-127, 2003.
22. 안상원, 이철완. 숙지황 (熟地黃)과 육미지황탕 (六味地黃湯)이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. *대전대 한의학논문집* 8(1):593-624, 1999.
23. 안병용, 최동성, 한종현. 대장균에서 4-nitroquinoline 1-oxide의 변이원성에 대한 숙지황 물추출물의 항돌연변이 작용특성. *한국생물공학회지* 16(5):486-493, 2001.
24. 안상욱, 김영길, 김민희, 이현용, 성낙술. 국내산 건지황과 숙지황의 생리활성 비교. *한국약용작물학회지* 7(4):257-263, 1999.
25. 조응행, 김윤상. 숙지황이 고과당사료를 식이한 쥐의 혈액상에 미치는 영향. *대한본초학회지* 18(1):73-79, 2003.
26. Tan, A.S., Berridge, M.V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J Immunol Methods* 238(1-2):59-68, 2000.
27. Carrillo, M.C., Kanai, S., Nokubo, M., Kitani, K. Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci* 48, pp 517-521, 1991.
28. Flohe, L., Glunzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105, pp 114-121, 1984.
29. Carlberg, I., Mannervik, E.B. Glutathione level in rat brain. *J Biol Chem* 250, pp 4475-4480, 1975.
30. Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N., Gillette, J.R. Bromobenzene induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* 11(3):151-169, 1974.
31. Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119(2):203-210, 1989.
32. Watson, J.M., Parrish, E.A., Rinehart, C.A. Selective potentiation of gynecologic cancer cell growth in vitro by electromagnetic fields. *Gynecol Oncol* 71, pp 64-71, 1998.
33. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275, 1951.
34. Krinsky, M. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 200, pp 248-234, 1992.
35. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Bio Med* 17, pp 235-248, 1994.
36. Condon, S. Response of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol Rev* 46, pp 269-280, 1987.
37. Cao, Y. Fu, Z.D., Wang, F., Liu, H.Y., Han, R. Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants. *J Asian Nat Prod Res* 7(3):205-213, 2005.