



## TOSC 법을 이용한 당알코올의 항산화 활성 평가

강건욱<sup>1</sup> · 곽상훈<sup>2</sup> · 윤세영<sup>1,2</sup> · 김상겸<sup>3</sup>

<sup>1</sup>조선대학교 약학대학, <sup>2</sup>LG 생활건강, <sup>3</sup>충남대학교 약학대학 형질전환 복제돼지 센터

## Evaluation of Antioxidant Activity of Sugar Alcohols Using TOSC (Total Oxy-radical Scavenging Capacity) Assay

Keon Wook Kang<sup>1</sup>, Sang Hoon Kwak<sup>2</sup>, Sei Young Yun<sup>1,2</sup> and Sang Kyum Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759

<sup>2</sup>LG Household and Healthcare Ltd., Research Park,

<sup>3</sup>College of Pharmacy and RCTCP, Chungnam National University, Daejeon 305-353, Korea

Received March 10, 2007; Accepted June 15, 2007

Although animal and epidemiological studies have suggested oxidative stress as an etiological factor in pathogenesis including cancer, inflammation, sepsis, fibrosis, cardiovascular/neurodegenerative diseases and aging-related disorders, conflicting results have been obtained in clinical trial with antioxidants. The reason for this discrepancy remains unknown but may be due, in part, to the lack of a validated assay system for evaluating antioxidant capacity. The antioxidant activity of a series of sugar alcohols against peroxy radicals, hydroxyl radicals and peroxy nitrates was determined by the total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) assay and cell-based assay using H4IIE cells. Specific TOSC values calculated from the slope of the linear regression for erythritol, xylitol, sorbitol or mannitol against peroxy radicals was  $2.1 \pm 0.2$ ,  $3.7 \pm 0.3$ ,  $9.1 \pm 0.3$  or  $8.7 \pm 1.1$  TOSC/mM, respectively. Specific TOSC values for erythritol, xylitol, sorbitol or mannitol against peroxy nitrate was  $1.9 \pm 0.3$ ,  $3.9 \pm 0.4$ ,  $7.8 \pm 0.7$  or  $7.7 \pm 0.5$  TOSC/mM, respectively. These results suggest that oxy-radical scavenging capacity is dependent on the number of aliphatic hydroxyl group in sugar alcohols of monosaccharide. *Tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP)-induced cell toxicity determined by MTT assay was marginally attenuated by 10 mM erythritol, but completely inhibited by 10 mM xylitol, 2 mM sorbitol or 0.75 mM maltitol, a disaccharide alcohol. Oxidative stress markers, such as glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels, were measured in *t*-BHP-treated cells using HPLC equipped with a fluorescence detector and a reverse phase column. Erythritol did not change the levels of GSH and MDA in H4IIE cells treated with *t*-BHP. The *t*-BHP-induced changes in cellular GSH and MDA levels were ameliorated by 10 mM xylitol and completely blocked by 10 mM sorbitol and maltitol. These results indicate that sugar alcohols protect cells against oxidative stress via scavenging oxy-radical and suggest that TOSC assay in conjunction with cell-based assay is a valid method for evaluating antioxidant capacity of natural and synthetic chemicals.

**Key words:** TOSC, Oxidative stress, Antioxidant activity, Cell-based assay, Sugar alcohols.

### 서 론

산화적 스트레스(oxidative stress)가 관찰되는 질환에서 항산화 체계의 저하가 대부분 동반되며 이들 질환을

가진 환자에 항산화 물질을 투여하여 증상을 완화 또는 치료하려는 시도가 광범위하게 진행되고 있다(Gilgun-Sherki *et al.*, 2002). 그러나 항산화 물질을 이용한 임상 연구는 종종 일치되지 않는 결과가 보고되고 있다(Harrison *et al.*, 2003; Adams *et al.*, 2003). 이러한 불일치의 원인은 불분명하나 항산화 물질의 장기치리가 항산화 효소의 발현을 감소시킬 수 있다는 점과 항산화 들

Correspondence to: Sang Kyum Kim, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea  
E-mail: sangkim@cnu.ac.kr

질의 활성을 평가하기 위한 방법이 부적절하다는 점이 제안되고 있다(Prior *et al.*, 2005). *In vitro*에서 사용되고 있는 항산화 활성 평가 방법은 측정원리에 의해 전자 전달(electron transfer) 또는 수소원소 전달(hydrogen atom transfer)로 나눌 수 있다. 대부분의 방법은 산화성 물질 또는 산화성물질을 생성하는 체계와 산화성물질과 반응하여 색, 형광, 발광 또는 ethylene gas를 생성하는 체계를 기반으로 구성된다. 대표적으로 사용되는 방법으로는 전자 전달을 기반으로 한 ferric reducing antioxidant power(Benzie and Strain, 1996), copper reduction assay(Apak *et al.*, 2004) 등과 수소원자 전달을 기반으로 한 oxygen radical absorbance capacity(Cao *et al.*, 1993), total radical-trapping antioxidant parameter (Ghiselli *et al.*, 1995) 그리고 전자 전달과 수소원자 전달이 혼합된 방법으로는 trolox equivalent antioxidant capacity(Miller *et al.*, 1993), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay(Nomura *et al.*, 1997)가 대표적이다. 이들 방법은 모두 장점과 함께 문제점을 가지고 있다. 예를 들어 DPPH 방법은 가장 광범위하게 사용되며 high-throughput system에 적용될 수 있는 장점이 있으나 흡광을 이용하기 때문에 시료물질과 간섭이 발생할 수 있고, 산화 환원반응 외에도 다른 반응에 의해서 흡광도가 영향을 받고, 특히 DPPH는 입체장애로 인해 고분자보다 저분자의 시료물질과 쉽게 반응한다는 단점이 있다(Prior *et al.*, 2005). 또한 대부분의 항산화 활성 평가 방법은 생체에서 생성되는 oxy-radical이 아닌 인공적인 radical, 즉, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, DPPH 등을 사용하는 단점을 가진다.

본 연구에서 사용한 TOSC(total oxy-radical scavenging capacity) 법은 total radical-trapping antioxidant parameter를 발전시킨 것으로 생체에서 생성되는 산화성물질인 hydroxyl radical과 peroxyxynitrite 그리고 인공적인 peroxy radical인 2,2'-azobis-2-amidinopropane에 대한 개별적인 항산화 활성을 평가하기 위해 개발되었다(Regoli and Winston, 1999). TOSC 법은 생체 시료 중의 항산화 활성 분석에 적용되어 환경오염에 대한 bio-marker와 산화적 스트레스의 지표로 사용되고 있다(Bocchetti and Regoli, 2006; Kim *et al.*, 2005). TOSC 법은 시료물질을 가하고 oxy-radical과 alpha-keto-gamma-methiobutylic acid가 반응하여 생성되는 ethylene gas를 시간에 따라 GC로 정량하여 AUC(area under the curve)를 구하고 이 값을 대조군의 값과 비교함으로써 정량적인 항산화 활성을 평가할 수 있다. 또한 대표적인 항산화 물질인 GSH 나 trolox의 항산화 활성 값과 비교함으로써 항산화 활성을 표준화할 수 있는 장점을 가진다. 그러나 TOSC 법이

화학구조에 따른 oxy-radical 포획능력의 변화를 반영하는 것에 관한 연구는 현재까지 미진한 실정이다.

본 연구에서는 포도당의 대체로 사용되고 있는 당알코올인 erythritol, xylitol, sorbitol 및 mannitol을 이용하여 TOSC 법이 구조-활성 관계를 반영하는 것을 실험하였다. 당알코올은 탄수화물에 존재하는 carbonyl 기를 hydroxyl 기로 환원시킨 건강기능성 식품 소재로 4탄당인 erythrose를 환원시킨 erythritol, 5탄당인 xylose를 환원시킨 xylitol, 6탄당인 glucose를 환원시킨 sorbitol, 즉 (2R,3R,4R,5S)-hexane-1,2,3,4,5,6-hexol과 그 이성질체인 mannitol, 즉 (2R,3R,4R,5R)-hexane-1,2,3,4,5,6-hexol 그리고 이당류를 환원시킨 maltitol 등이 존재한다. 특히 단당류를 환원시켜 얻어진 erythritol, xylitol, sorbitol과 mannitol은 모두 구조가 단순하고 탄소 수와 동일한 hydroxyl 기를 가지고 있어 구조와 활성관계를 실험하기에 적합한 물질로 판단하였다. 또한 세포에 *tert*-butylhydroperoxide(*t*BHP)를 처리하여 유발한 산화적 손상 모델에서 당알코올의 효과를 실험하여 TOSC 법에서 도출된 결과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**시약.** DMEM, fetal bovine serum, trypsin, penicillin/streptomycin은 Gibco(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Erythritol, xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, *t*BHP, 2,2'-azobis-2-amidinopropane, alpha-keto-gamma-methiobutylic acid, SIN-1, N-acetylcysteine, GSH, thiobarbituric acid, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]와 기타 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

**TOSC assay.** TOSC assay는 Winston *et al.*(1998)에 의해 제안되고 같은 저자들에 의해 보완된 방법(Regoli and Winston, 1999)을 기본으로 하여 수정되었다. Peroxy radical과 peroxyxynitrite는 각각 2,2'-azobisamidinopropane와 SIN-1을 35°C에서 자발적으로 분해시켜 발생시켰다. Hydroxyl radical은 Fe와 ascorbic acid를 이용한 Fenton reaction으로 발생시켰다. 발생한 각각의 oxy-radical은 alpha-keto-gamma-methiobutylic acid와 반응하여 ethylene gas를 발생하며 이 반응은 일정 범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고되었다(Winston *et al.*, 1998).

반응은 최종 volume 1 ml의 반응액을 rubber septum으로 밀폐된 15 ml 용기에 넣어 진행시켰다. Ethylene 생성은 반응용기의 head space에서 200  $\mu$ l의 공기를 취하

여 gas chromatography에 주입하고 분석하였다. 분석을 위해 Poropak N column과 flame ionization detector를 장착한 gas chromatograph를 사용하였다.

실험결과는 실험측정치로부터 구한 그래프를 integration하여 area under the kinetic curve(AUC)를 얻고 TOSC는 아래의 식으로부터 산출하였다.

$$TOSC = 100 - \left( \frac{\int SA}{\int CA} \times 100 \right)$$

where  $\int SA$  = integrated area from the curve of the sample reaction

$\int CA$  = integrated area from the curve of the control reaction

따라서 oxy-radical scavenging capacity를 전혀 갖지 못하는 시료의  $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며 TOSC=0의 값을 갖는다. 반대로  $\int SA \rightarrow 0$ 일 때는 TOSC 값은 100에 접근한다. Specific TOSC 값은 얻어진 TOSC 값을 시험물질에 농도에 따라 좌표화하고 선형회귀분석(linear regression analysis)을 통해 기울기를 얻은 후 이 값을 시험물질의 농도로 나누어 구하였다. TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기

타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

**세포배양.** 랫트의 간암에서 유래된 H4IIE 세포를 10% fetal bovine serum과 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin을 함유하는 DMEM 배지에  $1 \sim 2 \times 10^6$ /ml이 되도록 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Serum을 제거한 배지에서 세포를 14~16시간 동안 배양한 후 35 µM의 tBHP를 처리하였다.

**MTT assay.** 당알코올 또는 N-acetylcysteine를 가하고 1시간 후 tBHP를 세포에 처리하였다. tBHP 처리 후 3시간에 배지를 제거하고 0.5 mg/ml 농도의 MTT를 세포에 가하고 2시간 동안 반응시켰다. 세포배양액을 aspirator로 완벽하게 제거한 후 200 µl의 DMSO 액을 가하여 염색된 세포를 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 산화성물질을 처리하지 않은 세포의 생존율을 100%로 하여 상대 값을 표시하였다.

**GSH와 malondialdehyde(MDA) 측정.** GSH를 정량하기 위해 6-well culture plate의 well에 100 µl의 5% perchloric acid를 가하고 세포를 포집한 후 원심분리하여

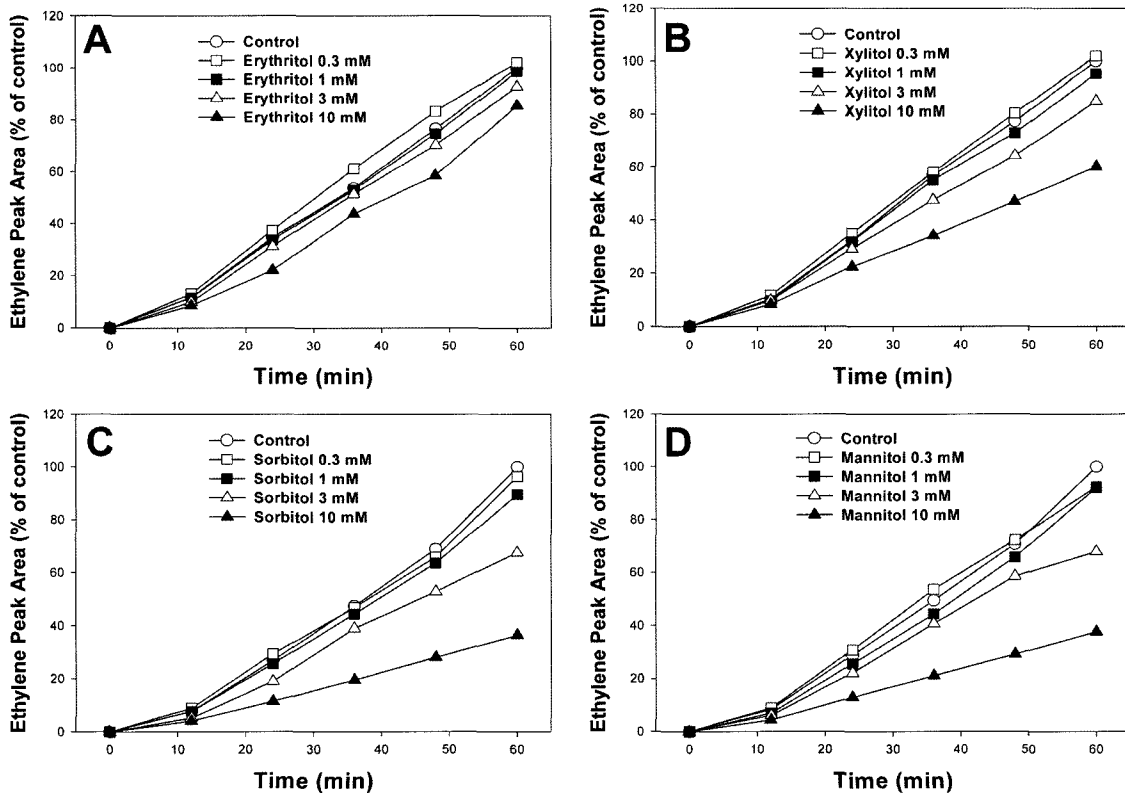


Fig. 1. Time-course of peroxyl radical scavenging capacity of erythritol (A), xylitol (B), sorbitol (C) and mannitol (D). Ethylene peak area are plotted as a percentage of the level observed in control samples at 60 min. Data are mean of duplicate experiments.

상등액을 취하였다. 원심분리 후 얻어진 침전물에 0.2 M NaOH 400  $\mu$ l를 가하여 용해시켜 단백질 함량을 측정하였다. MDA는 이전에 보고한 cell lysate buffer를 이용하여 세포를 포집하고 원심분리한 후 상등액을 분석에 사용하였다(Kim *et al.*, 2003). 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 BCA(bicinchoninic acid) 방법으로 정량하였다. GSH와 MDA는 각각 O-phthalaldehyde와 thiobarbituric acid로 유도체화하고 형광검출기와 C18 컬럼을 장착한 HPLC를 사용하여 분리 및 정량하였다(Kim and Kim, 2005; Kim *et al.*, 2005).

**통계 처리.** TOSC를 제외한 모든 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시했으며 군간에서 통계적인 유의성은 ANOVA-test 후 Newman-Keuls multiple range test로 확인하였다. 선형회귀분석은 SigmaPlot 2000을 사용하여 수행하였다.

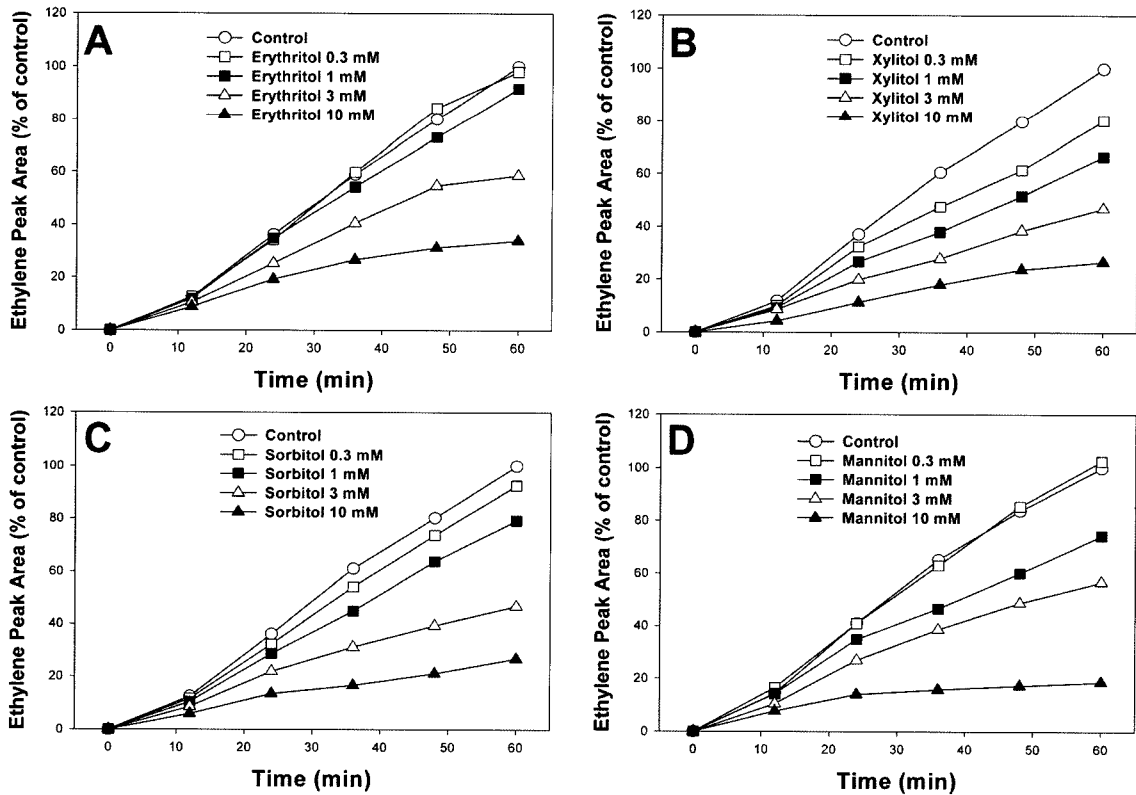
### 결 과

**당알코올의 oxy-radical 포획능 평가.** Peroxyl radical에 대한 당알코올의 포획능을 Fig. 1에 표시하였다. 선형회귀분석의 기울기에서 얻어진 erythritol, xylitol, sorbitol

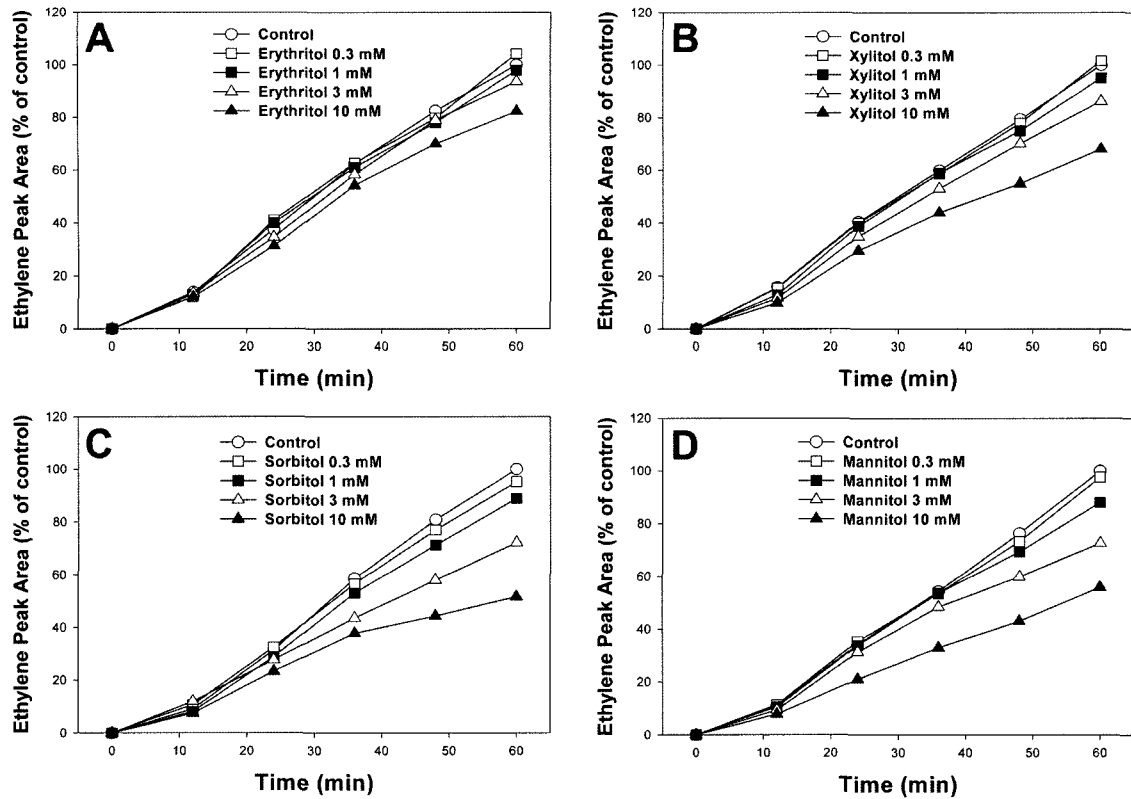
과 mannitol의 peroxy radical에 대한 specific TOSC 값은 각각  $2.1 \pm 0.2$ ,  $3.7 \pm 0.3$ ,  $9.1 \pm 0.3$ 과  $8.7 \pm 1.1$  TOSC/mM이었다. 이 값은 양성대조군으로 사용한 sulfhydryl 기를 함유한 GSH의 TOSC 값인  $313 \pm 31$  TOSC/mM에 비하여 매우 낮았다.

Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl radical에 대한 당알코올은 포획능은 Fig. 2에 표시하였다. 선형회귀분석의 기울기에서 얻어진 erythritol, xylitol, sorbitol과 mannitol의 hydroxyl radical에 대한 specific TOSC 값은 각각  $5.6 \pm 1.3$ ,  $14.7 \pm 4.5$ ,  $15.7 \pm 1.4$ 과  $13.8 \pm 6.0$  TOSC/mM이었다. 이 값은 양성대조군으로 사용한 GSH의 TOSC 값인  $86 \pm 9$  TOSC/mM에 비하여 낮았으나 전반적으로 peroxy radical에 대한 포획능에 비하여 1.6에서 4.0배로 높았다.

SIN-1(3-morpholinomorpholine)의 자발적인 분해과정에서 생성되는 peroxy nitrite에 대한 포획능은 Fig. 3에 표시하였다. 선형회귀분석의 기울기에서 얻어진 erythritol, xylitol, sorbitol과 mannitol의 peroxy nitrite에 대한 specific TOSC 값은 각각  $1.9 \pm 0.3$ ,  $3.9 \pm 0.4$ ,  $7.8 \pm 0.7$ 과  $7.7 \pm 0.5$  TOSC/mM이었다. 이 값은 양성대조군으로 사용한 GSH의 TOSC 값인  $116 \pm 1$  TOSC/mM에 비하여 현저



**Fig. 2.** Time-course of hydroxyl radical scavenging capacity of erythritol (A), xylitol (B), sorbitol (C) and mannitol (D). Ethylene peak area are plotted as a percentage of the level observed in control samples at 60 min. Data are mean of duplicate experiments.



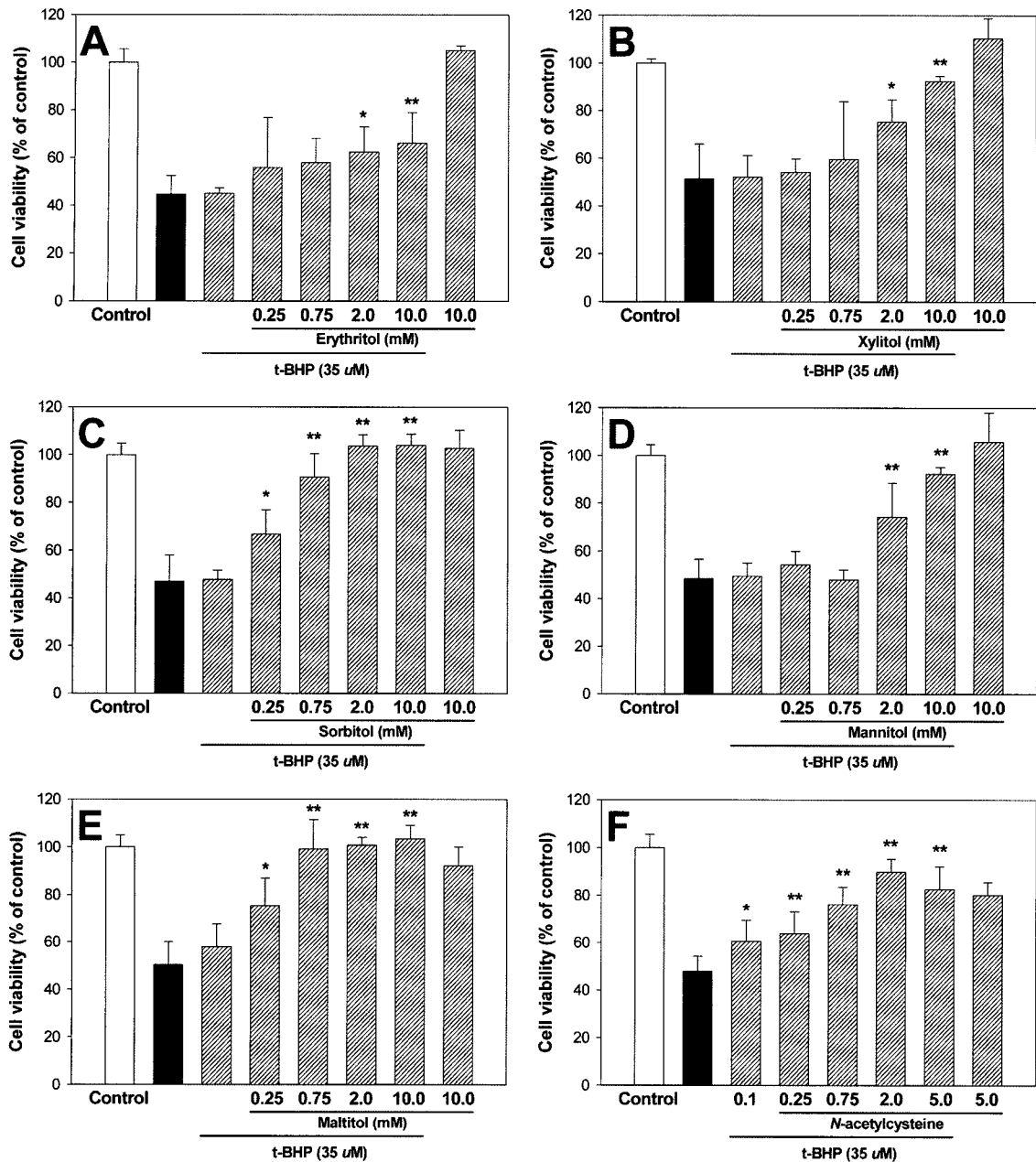
**Fig. 3.** Time-course of peroxynitrite scavenging capacity of erythritol (A), xylitol (B), sorbitol (C) and mannitol (D). Ethylene peak area are plotted as a percentage of the level observed in control samples at 60 min. Data are mean of duplicate experiments.

히 낮았다.

***t*-BHP에 의해 유도된 세포독성에서 당알코올의 효과.** 예비실험을 통하여 세포독성을 유도하기 위한 *t*-BHP의 농도와 시간을 35  $\mu$ M과 3시간으로 설정하였다. 35  $\mu$ M의 *t*-BHP는 약 50%의 세포 독성을 유발하였다(Fig. 4). Erythritol은 2 mM부터 *t*-BHP의 독성을 약화시켰으나 10 mM 농도에서도 cell viability는 약 66%로 독성 억제효과가 미약했다(Fig. 4A). Xylitol 역시 2 mM부터 독성 억제효과가 관찰되었으며 10 mM의 xylitol은 *t*-BHP에 의해 감소된 cell viability를 약 90%로 증가시켰다(Fig. 4B). Sorbitol은 농도의존적으로 *t*-BHP의 독성을 억제하여 2 mM 농도 부근에서 *t*-BHP의 독성을 완전히 억제하였다(Fig. 4C). Sorbitol의 이성질체인 mannitol 역시 2 mM 농도에서 *t*-BHP의 독성을 유의적으로 감소시켰으며 10 mM로 증가시켰을 때 독성은 완전히 차단되었다(Fig. 4D). 이당류인 maltose를 환원시켜 얻어지는 당알코올인 maltitol 역시 농도의존적인 독성 억제효과를 보였으며 약 0.75 mM 농도부터 완벽하게 *t*-BHP의 독성을 차단하였다(Fig. 4E). 양성 대조물질로 사용한 항산화제인 *N*-acetylcysteine 역시 농도의존적으로 *t*-BHP의 독

성을 억제하였으며 완전한 억제효과는 약 2 mM에서 관찰되었다(Fig. 4F). 첨가적으로 *N*-acetylcysteine의 단독 처리는 5 mM 농도에서 cell viability를 약 20% 감소시켰다.

***t*-BHP에 의한 GSH 감소 및 MDA 증가에 미치는 당알코올의 효과.** *t*-BHP에 의한 산화적 손상은 세포의 GSH를 감소시키고 지질과산화의 지표인 MDA를 증가시킨다(Alia *et al.*, 2006). 따라서 당알코올이 이들 지표에 미치는 영향을 실험하기 위해 GSH와 MDA를 형광검출기가 장착된 HPLC로 분리 및 정량하였다(Table 1). 예비실험을 통하여 GSH는 *t*-BHP를 처리하고 3시간 후 그리고 MDA는 *t*-BHP를 처리하고 15분 후에 시료를 준비하였다. Sugar alcohol은 모두 10 mM 농도로 전처리하였으며 *N*-acetylcysteine은 자체 독성이 없는 2 mM로 전처리하였다. *t*-BHP는 GSH 함량을 약 50% 감소시켰으며 반면 MDA 함량은 230%로 증가시켰다. Erythritol을 제외한 모든 sugar alcohol은 유의적으로 GSH의 감소와 MDA의 증가를 억제하였다. 특히, sorbitol과 maltitol은 완벽하게 *t*-BHP에 의한 산화적 스트레스의 지표 변화를 억제하였다.



**Fig. 4.** Effect of Erythritol (A), xylitol (B), sorbitol (C), mannitol (D), maltitol (E) and N-acetylcysteine (F) on cytotoxicity induced by t-BHP in H4IIE cells. Cells were treated with sugar alcohols or N-acetylcysteine (positive control) for 1 hour before addition of 35  $\mu$ M t-BHP for 3 hours. Data are means  $\pm$  S.D. of 3-6 experiments. \*\*\* Significantly different from levels monitored in cells treated with t-BHP only,  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ , respectively.

**고 찰**

산화적 스트레스는 산화성물질의 생성이 생체의 항산화 능력을 초과하여 세포에 손상을 유발할 수 있는 조건으로 전환되는 것을 의미한다(Sies, 1997). 세포에서 생성되는 산화성물질은 크게 세포의 대사과정에서 생성되는 singlet oxygen, superoxide anion, hydrogen peroxide, hy-

droxyl radical, nitric oxide, peroxyxynitrite, nitrous anhydride, hypochlorous acid 등과 외인성물질의 대사과정에서 생성되는 다양한 친전자성 물질로 나눌 수 있다. 이들 반응성이 강한 산화성 물질은 생체의 거대 분자인 생체막지질의 과산화, DNA 변성, 단백질의 손상뿐만 아니라 세포신호전달체계의 교란을 유발한다(Rhee *et al.*, 2003). 결과적으로 산화적 스트레스는 세포 손상(cellular

**Table 1.** Effects of sugar alcohol on intracellular GSH and MDA levels in H4IIE cells treated with *t*-BHP

	GSH (nmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Control	39.6 ± 3.3	0.027 ± 0.002
35 μM <i>t</i> -BHP	20.8 ± 4.8	0.062 ± 0.003
10 mM Erythritol + 35 μM <i>t</i> -BHP	24.6 ± 2.3	0.057 ± 0.004
10 mM Xylitol + 35 μM <i>t</i> -BHP	28.6 ± 1.3*	0.045 ± 0.003*
10 mM Sorbitol + 35 μM <i>t</i> -BHP	36.6 ± 2.2**	0.031 ± 0.005**
10 mM Mannitol + 35 μM <i>t</i> -BHP	33.2 ± 1.3**	0.034 ± 0.007**
10 mM Maltitol + 35 μM <i>t</i> -BHP	38.1 ± 1.2**	0.028 ± 0.003**
2 mM <i>N</i> -Acetylcysteine + 35 μM <i>t</i> -BHP	42.1 ± 2.3**	0.023 ± 0.005**

Cells were treated with sugar alcohols (10 mM) or *N*-acetylcysteine (2 mM) for 1 hour before addition of 35 μM *t*-BHP for 3 hours (GSH) or 15 min (MDA). Data are means ± S.D. of 3 experiments. \*\*\* Significantly different from levels monitored in cells treated with *t*-BHP only,  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ , respectively.

injury), 발암(carcinogenesis), 섬유화증(fibrosis), 심혈관계 질환(cardiovascular disease), 패혈증(sepsis), 허혈-재관류 손상(ischemic-reperfusion injuries), 인슐린 저항성과 관련된 대사증후군(metabolic syndrome), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 염증(inflammation), 퇴행성 뇌질환(Alzheimer's disease, Parkinson's disease), 노화(aging) 등 급성뿐만 아니라 다양한 만성질환의 유발에 기여한다. 따라서 산화적 스트레스가 동반되는 많은 질환에서 항산화 물질을 투여하여 질환의 발생을 예방하거나 증상을 완화시키려는 시도가 진행되고 있다.

본 연구에서는 최근 광범위한 적용가능성이 보고되고 있는 TOSC법이 oxy-radical에 대한 포획능에 대한 구조활성관계를 규명하기 위한 연구에 적용될 수 있는 가를 당알코올을 이용하여 확인하였다. 단당류의 당알코올은 탄소의 수와 hydroxyl 잔기의 수가 일치하며 수용액에서 용해도가 높아 실험에 사용하기에 적합하였다. 일반적으로 저분자의 항산화 물질은 GSH 등과 같이 sulfhydryl 관능기를 가지고 있거나 vitamin C나 E와 같이 hydroxyl 관능기를 가지고 있다. 따라서 당알코올의 oxy-radical 포획능은 hydroxyl 기(탄소의 숫자와 동일)의 증가에 비례할 것으로 예상되었다. 실험결과 peroxy radical과 peroxy-nitrite의 경우 당알코올의 탄소 수가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. Peroxy radical에 대한 specific TOSC 값을 당알코올에 존재하는 hydroxyl 기의 수로 나누었을 경우 erythritol, xylitol, sorbitol과 mannitol의 값은 각각 0.4, 0.7, 1.5와 1.5로 계산되었다. 이 결과는 peroxy radical에 대한 aliphatic hydroxyl 기의 포획능이 상가적(additive)보다는 상승적(synergic)임을 시사한다. Peroxynitrite에 대한 당알코올의 포획능을 hydroxyl 기의 숫자로 나눈 값은 erythritol, xylitol, sorbitol과 mannitol에서 각각 0.5, 0.8, 1.3과 1.3이었다. 이 결과는 peroxy radical과 유사하게 peroxy-nitrite에 대한 aliphatic hydroxyl 기의 포획능이 상승적으로 작용한다는 점을 시

사한다. Hydroxyl radical에 대한 specific TOSC 값은 erythritol에 비하여 xylitol, sorbitol과 mannitol이 약 2.5배 높게 관찰되었다. 그러나 당알코올의 hydroxyl 기가 5개에서 6개로 증가할 경우 hydroxyl radical의 포획능은 큰 변화를 보이지 않았다. Peroxy radical이나 peroxy-nitrite와 다른 hydroxyl radical에 대한 시험 결과의 기전은 본 연구로는 불분명하다. 그러나 본 실험에서 사용된 hydroxyl radical의 발생 기전이 철과 ascorbic acid에 의한 Fenton 반응에 기반하고 있다는 점을 고려할 때 당알코올의 ethylene gas 발생 억제효과가 hydroxyl radical에 대한 포획능 외에 철과 hydroxyl 기의 상호작용과 관련이 있을 가능성을 시사한다. 실제로 phenolic 구조를 가진 다양한 항산화 물질이 철과 착염을 형성하여 항산화 효과를 발휘하는 것으로 보고된 바 있다(Rathees *et al.*, 2006). 첨가적으로 이성질체인 sorbitol과 mannitol의 경우 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxy-nitrite에 대한 포획능은 매우 유사하였다. 이 결과는 당알코올의 경우 oxy-radical에 대한 포획능은 입체구조와는 무관함을 시사한다.

당알코올의 항산화 효과를 *t*-BHP에 의해 유도된 산화적 스트레스 유발 모델에서 실험하였다. 실험결과 TOSC법에서 얻어진 결과와 유사하게 당알코올에 존재하는 hydroxyl 기의 수가 증가함에 따라 MTT로 평가된 cell viability의 감소, 산화적 스트레스의 지표로 측정된 GSH의 감소와 MDA의 증가가 모두 억제되었다. 특히, 이당류인 maltose의 환원으로 얻어지는 maltitol은 0.75 mM에서 *t*-BHP의 독성을 완전히 억제하였다. 이 결과는 양성 대조군으로 사용된 *N*-acetylcysteine의 효과와 동등하거나 더 높았다. 산화적 손상을 억제하기 위해 사용되는 *N*-acetylcysteine은 흔히 5 mM 농도로 세포에 첨가된다(Abdelmegeed *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). 본 연구에서 5 mM의 *N*-acetylcysteine은 fetal bovine serum이 고갈된 조건에서 H4IIE 세포의 cell viability를 약

20% 낮추었다. 본 결과는 N-acetylcysteine과 같이 sulfhydryl 기를 가지고 있는 항산화 물질의 경우 세포에 독성을 유발할 수 있음을 시사한다. 실제로 250 mg/kg 용량으로 N-acetylcysteine을 복강주사했을 때 혈중 alanine transferase 및 aspartate transferase 등 간독성 지표가 혈청에서 증가하는 것을 확인하였다(unpublished data).

결론적으로 TOSC 법으로 평가된 당알코올의 oxy-radical 포획능은 hydroxyl 기의 숫자와 관련을 가지고 있는 것으로 판단된다. 특히 peroxy radical과 peroxy-nitrite의 경우 hydroxyl 기의 증가에 따른 상승적인 포획능 증가가 관찰되었다. 또한 세포배양 실험계에서 평가된 당알코올은 hydroxyl 기의 숫자에 의존적으로 산화적 스트레스에 의한 cell viability와 GSH 감소 및 MDA 증가를 억제하였다. 이상의 결과는 본 연구에서 사용된 *in vitro* TOSC 법과 tBHP를 산화제로 사용한 cell-based 방법이 화학 물질의 항산화 활성을 평가하기에 적합한 모델임을 시사한다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 형질전환복제되지 ERC 프로그램(grant R11-2002-100-00000-0)의 지원을 받았다.

## 참고문헌

- Abdelmegeed, M.A., Kim, S.K., Woodcroft, K.J. and Novak R.F. (2004). Acetoacetate activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in primary cultured rat hepatocytes: role of oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 728-736.
- Adams, L.A. and Angulo, P. (2003). Vitamins E and C for the treatment of NASH: duplication of results but lack of demonstration of efficacy. *Am. J. Gastroenterol.*, **98**, 2348-2350.
- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A.B., Bravo, L. and Goya, L. (2006). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **212**, 110-118.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M. and Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7970-7981.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, **239**, 70-76.
- Bocchetti, R. and Regoli, F. (2006). Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, **65**, 913-921.
- Cao, G., Alessio, H.M. and Cutler, R.G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free. Radic. Biol. Med.*, **14**, 303-311.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. and Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free. Radic. Biol. Med.*, **18**, 29-36.
- Gilgun-Sherki, Y., Rosenbaum, Z., Melamed, E. and Offen, D. (2002). Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol. Rev.*, **54**, 271-284.
- Harrison, S.A., Torgerson, S., Hayashi, P., Ward, J. and Schenker, S. (2003). Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.*, **98**, 2485-2490.
- Kim, S.K. and Kim, Y.C. (2005). Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *J. Hepatol.*, **42**, 907-913.
- Kim, S.K., Woodcroft, K.J. and Novak, R.F. (2003). Insulin and glucagon regulation of glutathione S-transferase expression in primary cultured rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 353-361.
- Kim, S.K., Woodcroft, K.J., Oh S.J., Abdelmegeed, M.A. and Novak, R.F. (2005). Role of mechanical and redox stress in activation of mitogen-activated protein kinases in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1785-1795.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci (Lond.)*, **84**, 407-412.
- Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A. and Kawakami, Y. (1997). Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem Mol. Biol. Int.*, **42**, 361-370.
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302.
- Rathee, J.S., Patro, B.S., Mula, S., Gamre, S. and Chattopadhyay, S. (2006). Antioxidant activity of piper betel leaf extract and its constituents. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9046-9054.
- Regoli, F. and Winston, G.W. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxy-nitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 96-105.
- Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R. and Kang, S.W. (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**(8 Suppl 3), S211-215.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, **82**, 291-295.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J. Jr., Fong, J.H. and Blanchard, K.A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 480-493.