

Raw 264.7 세포에서 유해산소 생성에 미치는 Caffeic Acid의 영향

최 병 철[#]

중앙대학교 약학대학

(Received September 8, 2008; Revised November 24, 2008)

Effect of Caffeic Acid on the Production of Reactive Oxygen Species in Raw 264.7 Cells

Byung-Chul Choi[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University

Abstract — To investigate effect of caffeic acid on the intracellular reactive oxygen species production, we used DHE for intracellular superoxide anion production, DCF for intracellular H_2O_2 production and DHR for intracellular hydroperoxide production in Raw 264.7 cells. DPPH assay showed that antioxidant activity of caffeic acid with $39.5 \mu M$ of IC_{50} values was similar to that of ascorbic acid with $41.3 \mu M$ of IC_{50} values. Caffeic acid dose-dependently inhibited silica-induced H_2O_2 and hydroperoxide production but did not affect superoxide anion production in Raw 264.7 cells, which suggest that antioxidant effect of caffeic acid acts on the post-step of superoxide anion. On the other hand, caffeic acid showed a potent antioxidant effect in $ICuSO_4$ -induced lipid peroxidation. Furthermore, plasma superoxide dismutase activity (3.43 ± 0.23 U/ml) in 10 mg/kg caffeic acid-fed mice was significantly higher than that (2.32 ± 0.24 U/ml) of control. From the above results, it is referred that caffeic acid appears to have potent anti-oxidant activity in both cell system and *in vivo* system.

Keywords □ caffeic acid, reactive oxygen species, nitric oxide, superoxide dismutase

세포에서 생성되는 reactive oxygen species(ROS)의 종류는 superoxide anion, hydrogen peroxide와 hydroxyl radical 등이 있으며, 또한 nitric oxide는 superoxide anion과 결합하여 peroxynitrite를 형성하여 세포에 비가역 손상을 일으킨다.¹⁾ 이러한 ROS를 제거하는데 있어서 항산화제는 중요한 역할을 담당하고 있는데 식물체내에 존재하는 다양한 종류의 flavonoid나 phenylpropanoid 등은 강력한 항산화 기능을 갖고 있으므로 이들의 섭취는 인체 내에서 생성되는 ROS로부터 신체기능을 보호해주고 있다.^{2,3)}

Caffeic acid는 phenylpropanoid 계열의 화합물로서 벤젠기에 2개 hydroxyl기를 갖으며 항산화 작용을 비롯하여 다양한 약리활성을 갖는 물질로 알려져 있다. 지금까지 알려진 caffeic acid의 작용을 살펴보면 흰쥐에서 caffeic acid는 지질과산화물 생성을 억제하고, ROS를 제거하는데 관여하는 glutathion peroxidase의 활성을 증가시키는 기전을 통해 심근의 산화성 스트레스를 감소시키며,⁴⁾ 열 손상에 의한 신장과 폐 조직의 산화성 스트레스를 억

제하였다.⁵⁾ 또한 caffeic acid 유도체들은 Raw 264.7 세포에서 lipopolysaccharide에 의한 NO 생성을 억제하였다.⁶⁾ 이러한 항산화 작용이외에 항염증 작용도 보고 되고 있다. Caffeic acid phenethyl ester가 사람 구강 상피세포에서 COX-2의 발현을 억제하며⁷⁾ lipoxigenase를 억제한다는 보고가 있다.⁸⁾ 또한 흰쥐의 복강비만세포에서 ATP에 의한 histamine 유리를 caffeic acid가 억제한다는 보고도 있다.⁹⁾

세포에서 생성되는 superoxide anion은 superoxide dismutase에 의해 H_2O_2 로 전환되며, 세포내에 존재하는 catalase나 peroxidase에 의하여 무해한 산소와 물로 전환된다. 이 실험에서는 세포내에서 생성되는 여러 가지 종류의 ROS를 측정하는 시약들을 이용하여 caffeic acid가 세포내에서 생성되는 어떠한 유해산소의 생성을 억제하며, 생체내에서도 항산화 기능을 나타내는 지를 관찰하였다.

실험 방법

재료

Caffeic acid, 1-diphenyl-2-picrylhydroazyl(DPPH), xanthine oxidase(XO), NBT(nitroblue tetrazolium chloride), hypoxanthine,

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-3426-5664 (팩스) 02-3426-2638
(E-mail) choibych@unitel.co.kr

2-thiobarbituric acid, malonyldialdehyde, hexadecyltrimethyl ammonium bromide(HTAB), 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB), N,N-dimethylformamide(DMF)들은 Sigma사로부터 구입하였으며, dihydrorhodamine(DHR), dihydroethidium, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)는 Molecular Probe Co.에서 구입하였다.

세포 배양

Raw 264.7 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(100 IU/50 µg/ml)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 superoxide 생성, 세포내 H₂O₂ 생성, 세포내 hydroperoxide 생성 및 지질과산화물을 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 정량

96 well plate에 에탄올에 녹인 0.1 mM DPPH 용액 180 µl와 각 농도별로 조제한 caffeic acid 20 µl를 가하고 37°C에서 30분간 배양한 후 FL600 spectrofluorometer(Bio-Tek, Winooski, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포내 superoxide anion 생성 측정

Raw 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액(mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 0.4, MgCl₂ 0.5, HEPES[pH 7.4] 10, CaCl₂ 1.8, glucose 5)에 분산시킨 후 10 µM dihydroethidium을 가하고 1시간 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. Dihydroethidium이 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 10⁵ cells/ml로 분주하고 caffeic acid를 전처리 한 후 silica 1 mg/ml을 가하여 30분간 superoxide anion 생성을 유도하였다. 원심분리 후 cell pellet을 200 µl의 Krebs 용액에 분산시킨 후 형광(Ex: 480 nm; Em: 586 nm)을 측정하였다.

세포내 H₂O₂ 생성 측정

Raw 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액에 suspend 시킨 후 20 µM DCF-DA를 가하고 1시간 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. DCF-DA가 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 10⁵ cells/ml로 분주하고 caffeic acid를 전처리 한 후 silica 1 mg/ml을 가하여 30분간 H₂O₂ 생성을 유도하였다. 원심분리 후 cell pellet을 200 µl의 Krebs 용액에 분산시킨 후 형광(Ex: 485 nm; Em: 535 nm)을 측정하였다.

세포내 hydroperoxide 생성 측정

Raw 264.7 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액에 suspend 시킨 후 10 µM DHR를 가하고 30분간 빛을 차단한 장소에서 배양하였다. DHR이 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후

10⁵ cells/ml로 분주하고 여러 농도의 caffeic acid를 전처리 한 후 silica 1 mg/ml을 가하여 30분간 hydroperoxide 생성을 유도하였다. 원심분리 후 cell pellet을 200 µl의 Krebs 용액에 분산 시킨 후 형광(Ex: 488 nm; Em: 515 nm)을 측정하였다.

Nitrite의 측정

NO의 생성은 Nitrite를 측정함으로써 간접적으로 확인하였으며, Griess reagent A(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid)와 Griess reagent B(0.1% naphthylenediamine in 5% phosphoric acid)를 사용하였다. RAW264.7 세포에 caffeic acid와 lipopolysaccharide 1 µg/ml을 처리하고 24시간 배양하였다. 배양액에 Griess reagent A와 B를 동량 섞은 용액을 가하고 5분간 37°C에서 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.^{10,11)}

지질과산화 측정

세포막의 지질과산화를 측정하기 위하여 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 형광을 이용하였다. caffeic acid와 100 µM CuSO₄를 1시간 처리한 Raw 264.7 세포를 0.5 mM DTT를 함유한 PBS buffer로 세척한 후 sonication하고 50% trichloroacetic acid를 가하여 최종 5% 농도로 조절하였다. 동량의 0.325% 2-thiobarbituric acid(in 50% acetic acid)를 첨가하여 95°C에서 30 min 배양하였다. 원심분리 후 200 µl를 96 well plate에 옮기고 Ex: 485 nm, Em: 535 nm에서 형광 측정하였다. 표준물질로서는 malonyldialdehyde(1,1,3,3-tetraethoxypropane, Sigma)를 사용하였다.¹²⁾

혈장 superoxide dismutase 측정

체중이 20~25 g 정도 되는 숫컷 Balb-c 생쥐에 매일 10일간 10 mg/kg caffeic acid를 경구투여 한 후 혈액을 채취하여 혈장내 superoxide dismutase의 활성을 아래의 방법으로 측정하였다. 0.6 mM hypoxanthine, 1 mM EDTA, 0.2 mM NBT를 함유하는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 400 µl에 superoxide dismutase 및 혈장 10 µl를 가하여 잘 혼합하였다. 반응은 xanthine oxidase(1 U/ml) 100 µl를 가하면서 시작하였다. 반응 혼합액을 37°C에서 5분간 배양한 후 96 well plate에 200 µl씩 소분하고 FL600 spectrofluorometer를 이용하여 645 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹³⁾

자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t test와 ANOVA로 검정하였고 P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

실험결과 및 고찰

Raw 264.7 세포내에서 caffeic acid의 항산화 작용

Caffeic acid는 phenylpropanoid 계열의 화합물로서 벤젠기에 2개 hydroxyl기를 갖으며 항산화 작용을 비롯하여 다양한 약리 활성을 갖는 물질로 알려져 있다. 먼저 caffeic acid의 자체 항산화 효과를 관찰하기 위하여 DPPH radical 소거를 관찰하였다. Caffeic acid는 농도 의존적으로 DPPH radical을 소거하였다(Fig. 1). Caffeic acid의 IC₅₀ 값은 39.5 μM로서 ascorbic acid의 IC₅₀ 값인 41.3 μM과 유사하였다. 이러한 결과는 caffeic acid 자체가 강력한 항산화 작용을 갖고 있음을 제시하여 준다.

배양세포에서 생성되는 superoxide anion은 superoxide dismutase에 의해 H₂O₂로 전환되며, 세포내에 존재하는 catalase 나 peroxidase에 의하여 무해한 산소와 물로 전환되지만 만약 유해산소의 제거가 원활히 이루어지지 않는 경우 DNA, 단백질 및 지질의 산화가 일어나 세포 손상을 유래하게 된다. 이 실험에서는 세포내에서 생성되는 여러 가지 종류의 ROS를 측정하는 시약들을 이용하여 caffeic acid가 세포내에서 생성되는 어떠한 유

해산소를 억제하는지 관찰하였다. 유해산소의 생성은 Raw 264.7 세포를 silica로 자극하였다. Silica는 다양한 세포에서 유해 산소 생성을 증가시킨다는 것이 이미 보고되었으며¹³⁾ Table I에서 보 다시피 Raw 264.7 세포에서 silica는 농도 의존적으로 유해산소 생성을 증가시켰다.

먼저 세포내에서 생성되는 superoxide anion 생성은 dihydroethidium를 이용하여 측정하였다.¹⁴⁾ Silica 1 mg/ml은 Raw 264.7 세포에서 superoxide anion 생성을 2.5배 증가시켰다. 그러나 caffeic acid는 silica에 의해 생성되는 세포내 superoxide anion에는 별 다른 영향을 주지 않았다(Fig. 2). 이 결과로 미루어 볼 때 caffeic acid는 superoxide anion의 생성과 분해에 있어서 직접적인 작용은 없는 것으로 사료된다.

세포내 유해산소의 일종인 H₂O₂는 DCF-DA를 이용하여 측정하였다.¹⁵⁾ Silica 1 mg/ml은 Raw 264.7 세포에서 H₂O₂ 생성을

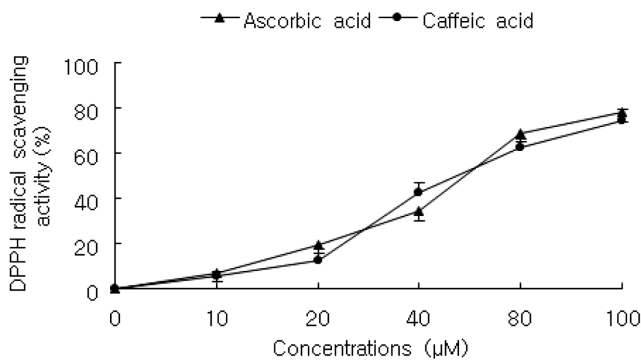


Fig. 1 – DPPH radical scavenging activity of caffeic acid. A solution of 180 μl of 100 μM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 μl of caffeic acid for 30 min and the absorbance was measured at 517 nm. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

Table I – Dose-response of reactive oxygen species generation to silica in Raw 264.7 cells

Silica (mg/ml)	% Increase of Control		
	DHE	DCF	DHR
0	100.0	100.0	100.0
0.5	164.2±15.2	225.2±21.2	173.2±11.4
1.0	256.0±17.1	377.4±28.2	217.0±12.4
2.0	432.2±26.3	622.2±33.9	410.2±24.8
4.0	553.2±33.2	751.7±42.3	520.2±52.8

DHE: used for measurement of intracellular superoxide anion production.
 DCF: used for measurement of intracellular H₂O₂ production.
 DHR: used for measurement of intracellular hydroperoxide production.

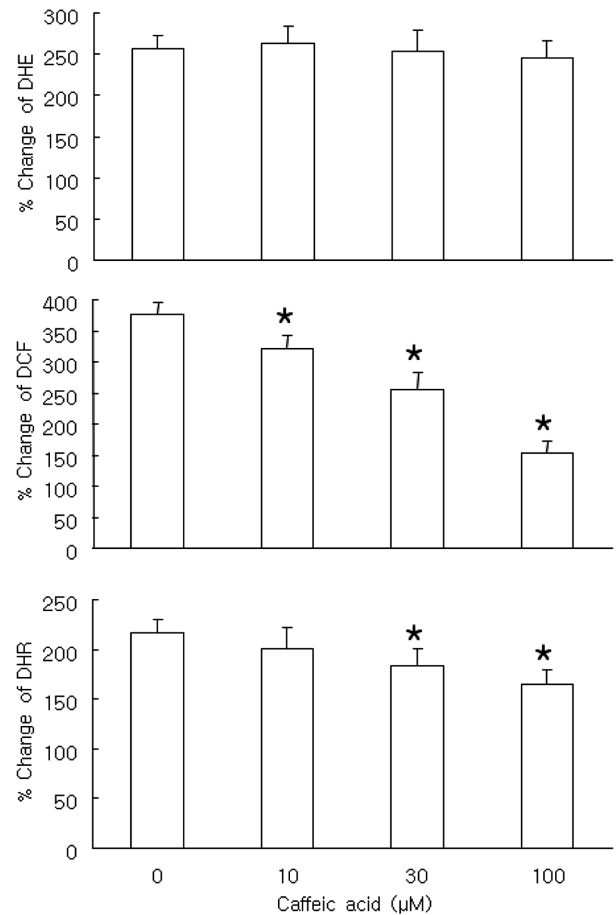


Fig. 2 – Effect of caffeic acid on 1 μg/ml silica-induced ROS production in Raw 264.7 cells. DHE was used for measurement of intracellular superoxide anion production, DCF for measurement of intracellular H₂O₂ production and DHR for measurement of intracellular hydroperoxide production. Results are means ± SD from 4 separate experiments. *Significantly different from silica alone (p < 0.05).

3.7배 증가시켰다. Caffeic acid는 silica에 의해 생성되는 세포내 H_2O_2 를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2). 한편 세포내 peroxynitrite를 포함한 hydroperoxide 생성을 DHR를 이용하여 측정 한 실험에서¹⁶⁾ silica 1 mg/ml은 Raw 264.7 세포에서 2.1배 증가시켰다(Fig. 2). 이러한 결과는 caffeic acid의 세포내 항산화 효과가 H_2O_2 이후 단계에서 나타나고 있음을 제시하여 준다.

Raw 264.7 세포에서 NO 생성에 미치는 영향

NO도 ROS의 일종으로 혈관을 이완시키며 다양한 생리 작용을 나타내고 있다. NO는 superoxide와 결합하여 peroxynitrite를 형성하며 이는 단백질을 nitration 시키므로써 세포에 비가역적 손상을 일으키는 유해한 물질로 알려져 있다.¹⁾ 앞선 DHR를 이용한 실험에서 caffeic acid는 silica에 의한 hydroperoxide의 생성을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과를 확인하기 위하여 같은 세포에서 lipopolysaccharide에 의한 NO 생성을 측정 한 결과 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3). 이 결과는 항산화 기능을 갖는 물질이 대식세포에서 NO 생성을 억제한다는 결과와 일치하고 있다.^{17,18)} 이러한 결과는 caffeic acid가 NO 생성을 억제하며 세포내 ROS 생성도 억제하므로써 비가역적 손상을 일으키는 peroxynitrite의 생성을 억제하므로써 세포의 손상을 방지 할 것으로 사료된다.

Raw 264.7 세포에서 $CuSO_4$ 에 의한 지질과산화에 미치는 영향

세포에서 생성되는 reactive oxygen species들은 세포막이나 세포내 소기관의 막을 산화시켜 생성되는 지질과산화물을 생성한다.¹⁹⁾ $CuSO_4$ 100 μM 은 Raw 264.7 세포에서 대조군에 비하여 2배 증가시켰다. caffeic acid는 $CuSO_4$ 에 의한 지질과산화물 생성도 유의하게 억제하였다(Fig. 4). 이 결과도 세포내에서 생성되는 ROS를 caffeic acid가 유의하게 감소시킴으로써 나타나는 결과일 것으로 사료된다.

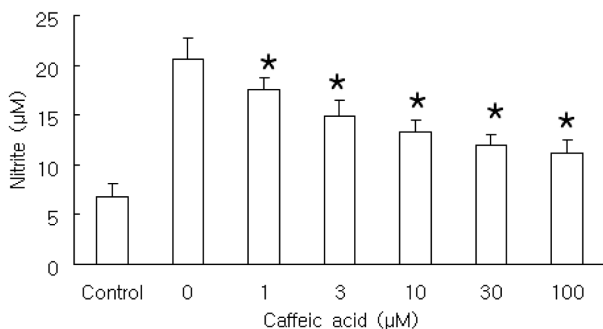


Fig. 3 – Effect of caffeic acid on 1 $\mu g/ml$ lipopolysaccharide-induced NO production in Raw 264.7 cells. The cells were incubated with 1 $\mu g/ml$ lipopolysaccharide in the presence or absence of caffeic acid. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. *Significantly different from lipopolysaccharide alone ($p < 0.05$).

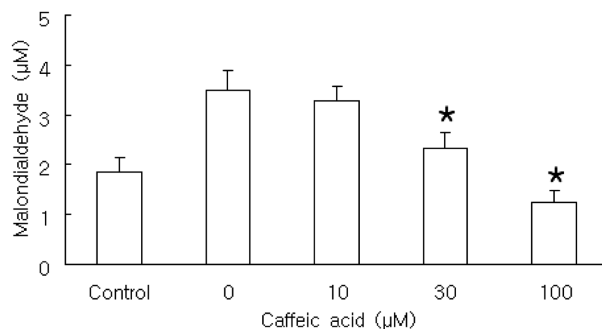


Fig. 4 – Effect of caffeic acid on 100 μM $CuSO_4$ -induced lipid peroxidation in Raw 264.7 cells. The cells were incubated with 100 μM $CuSO_4$ in the presence or absence of caffeic acid. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. *Significantly different from $CuSO_4$ alone ($p < 0.05$).

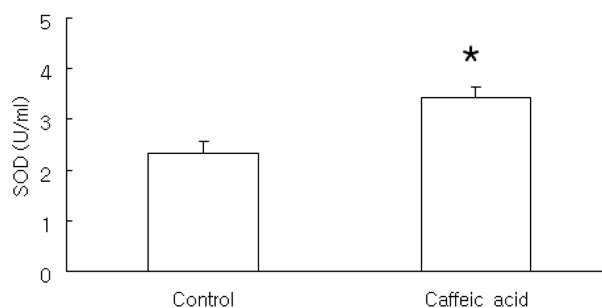


Fig. 5 – Effect of caffeic acid on plasma superoxide dismutase (SOD) in caffeic acid-fed mice. Results are means \pm SD from 6 separate experiments. *Significantly different from control ($p < 0.05$).

Caffeic acid를 경구 투여한 생쥐 혈장에서 superoxide dismutase 활성 변화

이전 결과로 볼 때 caffeic acid는 세포내에서 생성되는 ROS를 유의하게 억제하는 것으로 보인다. 이러한 caffeic acid의 항산화 효과가 *in vivo*에서도 나타나는 것을 확인하기 위하여 caffeic acid를 생쥐에 10일간 경구 투여한 후 혈장내 SOD 활성을 측정하였다. 대조군의 혈장내 SOD 활성은 2.32 ± 0.24 U/ml이었으며, caffeic acid를 투여한 시험군의 혈장내 SOD 활성은 3.42 ± 0.23 U/ml로 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 5). 항산화제의 일종인 propofol은 혈관이 막힌 후 재관류시킨 사람에서 혈장내 SOD의 활성을 증가시킨다는 보고가 있다.²⁰⁾ 이 결과들을 종합하여 볼 때 caffeic acid는 세포내에서 발생하는 ROS의 생성을 유의하게 억제할 뿐만 아니라 생체내에서도 항산화 효과를 나타내고 있음을 보여주고 있다.

문 헌

- 1) Kuo, W. N., Kanadia, R. N. and Shanbhag, V. P. : Denitration of

- peroxynitrite-treated proteins by "protein nitrates" from dog prostate. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47**, 1061 (1999).
- 2) Lee, J. Y., Yoon, J. W., Kim, C. T. and Lim, S. T. : Antioxidant activity of phenylpropanoid esters isolated and identified from *Platycodon grandiflorum* A. DC. *Phytochemistry* **65**, 3033 (2004).
 - 3) Beyer, G. and Melzig, M. F. : Effects of selected flavonoids and caffeic acid derivatives on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells. *Planta. Med.* **69**, 1125 (2003).
 - 4) Okutan, H., Ozcelik, N., Ramazan Yilmaz, H. and Uz, E. : Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin. Biochem.* **38**, 191 (2005).
 - 5) Gurel, A., Armutcu, F., Hosnuter, M., Unalacak, M., Kargi, E. and Altinyazar, C. : Caffeic acid phenethyl ester improves oxidative organ damage in rat model of thermal trauma. *Physiol. Res.* **53**, 675 (2004).
 - 6) Da Cunha, F. M., Duma, D., Assrey, J., Buzzi, F. C., Niero, R., Campos, M. M. and Calixto, J. B. : Caffeic acid derivatives: *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties. *Free. Radic. Res.* **38**, 1241 (2004).
 - 7) Michaluart, P., Masferrer, J. L., Carothers, A. M., Subbaramaiah, K., Zweifel, B. S., Koboldt, C., Mestre, J. R., Grunberger, D., Sacks, P. G., Tanabe, T. and Dannenberg, A. J. : Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res.* **59**, 2347 (1999).
 - 8) Mufti, N. A. and Shuler, M. L. : Possible role of arachidonic acid in stress-induced cytochrome P450IA1 activity. *Biotechnol. Prog.* **12**, 847 (1996).
 - 9) Lee, Y. H., Lee, S. J., Seo, M. H., Kim, C. J. and Sim, S. S. : ATP-induced histamine release is in part related to phospholipase A2-mediated arachidonic acid metabolism in rat peritoneal mast cells. *Arch. Pharm. Res.* **24**, 552 (2001).
 - 10) Naoaki, M., Isao, S., Toru, M., Naoto, U. and Eikai, K. : Aged garlic extract enhances production of nitric oxide. *Life Sciences* **71**, 509 (2002).
 - 11) Toshifumi, T., Baier, L. D. and Morrison, A. R. : Antioxident inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 11689 (1996).
 - 12) Waters, S., Fae, A., Gondalia, J., Holm, J., Karlstrom, L., Nilsson, U. and Jonsson, O. : Effects of pretreatment with a xanthine oxidase inhibitor on free radical levels during carotid endarterectomy. *Free. Radic. Res.* **38**, 283 (2004).
 - 13) Cho, Y. J., Seo, M. S., Kim, J. K., Lim, Y., Chae, G., Ha, K. S. and Lee, K. H. : Silica-induced generation of reactive oxygen species in Rat2 fibroblast: role in activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 708 (1999).
 - 14) Siegel, D., Gustafson, D. L., Dehn, D. L., Han, J. Y., Boonchoong, P., Berliner, L. J. and Ross, D. : NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1238 (2004).
 - 15) Woo, C. H., Eom, Y. W., Yoo, M. H., You, H. J., Han, H. J., Song, W. K., Yoo, Y. J., Chun, J. S. and Kim, J. H. : Tumor necrosis factor-alpha generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A₂-linked cascade. *J. Biol. Chem.* **275**, 32357 (2000).
 - 16) Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T. and Nakagawa, Y. : Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.* **351**, 183 (2002).
 - 17) Matsuda, H., Kageura, T., Oda, M., Morikawa, T., Sakamoto, Y. and Yoshikawa, M. : Effects of constituents from the bark of *Magnolia obovata* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **49**, 716 (2001).
 - 18) Arteel, G. E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J. and Sies, H. : Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol. Chem.* **379**, 1201 (1998).
 - 19) Boland, A., Delapierre, D., Mossay, D., Hans, P. and Dresse, A. : Propofol protects cultured brain cells from iron ion-induced death: comparison with trolox. *Eur. J. Pharmacol.* **404**, 21 (2000).
 - 20) Turan, R., Yagmurdu, H., Kavutcu, M. and Dikmen, B. : Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *Eur. J. Anaesthesiol.* **24**, 185 (2007).