

H₂O₂ 유도 8-OH2'dG 생성 및 DNA Single Strand Break에 미치는 Galangin의 억제 효과

김수희 · 허문영[#]

강원대학교 약학대학

(Received September 25, 2009; Revised December 17, 2009; Accepted December 18, 2009)

Suppressive Effect of Galangin on the Formation of 8-OH2'dG and DNA Single Strand Breaks by Hydrogen Peroxide

Soo Hee Kim and Moon Young Heo[#]

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — The aim of this study was to evaluate the effect of galangin towards hydrogen peroxide-induced DNA damage. The calf thymus DNA and Chinese Hamster Lung (CHL) cells were used to measure 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH2'dG) as an indicator of DNA oxidative damage using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Hydrogen peroxide in the presence of Fe(II) ion induced the formation of 8-OH2'dG in both calf thymus DNA and CHL cells. The DNA damage effects were enhanced by increasing the concentration of Fe(II) ion and inhibited by galangin. In the single cell gel electrophoresis (Comet assay), galangin and *dl*- α -tocopherol showed an inhibitory effect in CHL on hydrogen peroxide induced DNA single strand breaks. Galangin showed more potent activity than *dl*- α -tocopherol under our experimental conditions. These results indicate that galangin can modify the action mechanisms of the oxidative DNA damage and may act as chemopreventive agents against oxidative stress.

Keywords □ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH2'dG), hydrogen peroxide, Fe(II) ion, DNA damage, galangin, chemopreventive agents, comet assay

노화와 관련된 상당수의 퇴행성 질환들에 있어서 중요한 원인으로 알려진 것이 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이다.^{1,2)} 이들은 세포호흡(cellular respiration)이나 이물질 대사 중 산화과정에서 많이 발생하는데 상당부분 체내의 자체방어기전에 의해 소거된다.³⁾ 그러나 일부 세포에서는 ROS에 의한 산화적 DNA 손상의 결과로 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH2'dG) 같은 부가체(adduct)들이 생성되며 DNA strand breaks가 일어난다. 따라서 이러한 유전독성 바이오마커(genotoxic biomarker)들을 이용하여 세포내 DNA 손상정도를 측정할 수 있다.⁴⁾ 본 연구에서는 ROS로서 작용하는 H₂O₂에 의해 생성되는 DNA 산화적 손상과 DNA 절단에 대하여 항산화 flavonoid 중의 하나인 galangin의 보호효과를 규명하기 위하여 8-OH2'dG 분석과 single cell gel electrophoresis(SCGE)를 실시하였다. 본 연구에서 galangin과 같은 flavonoid 화합물이 항산화 비타민인 *dl*- α -

tocopherol(vit-E)보다 생리활성이 더 컸으며 이에 관련된 결과들을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

실험재료

Galangin(>95%, HPLC, Fig. 1), *dl*- α -tocopherol(vit-E), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH2'dG), 2'-deoxyguanosine(2'dG), calf thymus DNA은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO 63178, USA)에서 구입하여 사용하였다. Minimum essential medium(MEM), fetal bovine serum(FBS) 등 세포배양시약은 GIBCO사(Introvigen Co., Carlsbad, CA 92008, USA)에서 구입하여 사용하였고, H₂O₂ 등 그 외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. 8-OH2'dG 분석을 위해서는 HPLC용 methanol과 water를 사용하였다.

배양세포

본 실험의 *in vitro* 연구에서 사용된 세포주는 ATCC로부터 구

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6914 (팩스) 033-255-7865
(E-mail) myheo@kangwon.ac.kr

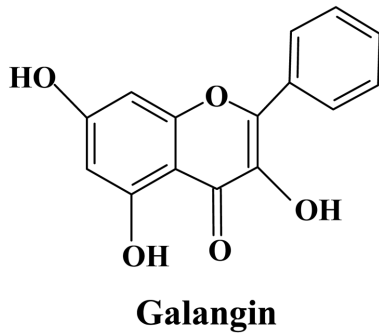


Fig. 1 – The chemical structure of galangin.

입한 Chinese hamster lung(CHL) cell을 사용하였다. 세포배양은 10% FBS, 1% l-glutamine, 1% penicillin-streptomycin을 함유한 MEM 배지를 사용하였다.

Calf thymus DNA에서 8-OH₂'dG의 정량

Calf thymus DNA(1 mg/ml in 14 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) 100 μl에 전처리(pre-treatment)법의 경우에는 시료물질인 vit-E 또는 galangin을 농도별로 처리한 후 37°C에서 3시간 동안 incubation시켰다. 이후 양성대조물질로서 소정의 최종농도가 되도록 H₂O₂와 FeCl₂ 용액을 가해 30분간 노출시켰다. 동시투여(simultaneous treatment)법의 경우에는 시료물질을 농도별로 처리하고 즉시 양성대조물질로서 소정의 최종농도가 되도록 H₂O₂와 FeCl₂ 용액을 가해 3시간 30분간 노출시켰다. 3M sodium acetate(NaOAc) 10 μl, ethanol 2.5 ml를 가해 -80°C에서 1시간 동안 동결 후 녹인 다음 3000 rpm에서 15분간 원심분리해서 pellet을 얻었다. 이것을 10 mM Tris(pH 7.4 containing 1 mM EDTA) 0.3 ml, 0.5 M NaOAc 30 μl, 0.25 M MgCl₂ 10 μl를 가한 후 5분간 끓이고 10분 동안 냉각하였다. 다음 nuclease P1(0.5 mg/ml) 10 μl를 가해 50°C에서 30분간 반응시키고 1 M Tris(pH 10.6) 10 μl와 alkaline phosphatase(0.1 unit/μl) 10 μl를 가해 37°C에서 1시간 배양시켰다. 이어서 5.8 M acetic acid 4 μl를 가해 0.2 μm filter로 여과해서 이를 electrochemical-detector(guard cell-850 mV, analytical cell-400 mV)와 UV-detector(260 nm)를 장착한 HPLC로 C-18 칼럼을 써서 이동상용매로서는 100 mM sodium acetate in 5% MeOH(pH 5.2 with H₃PO₄)를 써서 8-OH₂'dG와 2'-dG를 동시에 분리정량하였다.⁵⁻¹²⁾ 결과치는 10⁵ 분자의 2'-dG 중 8-OH₂'dG의 비율(8-OH₂'dG/10⁵ 2'-dG)로 나타내었다.

CHL에서 8-OH₂'dG 정량

CHL cell을 10⁶개를 10 cm dish에 심고 24 시간 동안 배양시킨 다음 vit-E 또는 galangin을 농도별로 12시간 처리한 후(pre-treatment법) 양성대조물질로서 소정의 최종농도가 되도록 H₂O₂

와 FeCl₂를 가해 30분간 37°C에서 산화적 DNA 손상을 주었다. 다음 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 취하여 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 제거한 후 DPBS를 1 ml 가하여 1000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 다시 상등액을 제거한 후 lysis buffer(10 mM Tris HCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2) 3 ml, 10% SDS(pH 7.2) 200 μl, proteinase-K(20 mg/ml) 50 μl, RNAase A(20 mg/ml) 40 μl를 가하여 37°C에서 밤새 배양시킨다. 여기에 6 M NaCl 1 ml를 가하여 거품이 생길 정도로 격렬하게 vortex한 후 15분간 얼음에 담갔다 2000 rpm에서 15분간 원심분리한다. 상등액을 조심스럽게 취하여 ethanol을 가하여 DNA pellet을 얻는다. 10 mM Tris(pH 7.4 containing 1 mM EDTA) 0.3 ml 0.5 M sodium acetate(NaOAc) 30 μl, 0.25 M MgCl₂ 10 μl를 가한 후 5분간 boiling시키고 5~10분 동안 냉각하였다. Nuclease P1(0.5 mg/ml) 10 μl를 가해 50°C에서 30분간 incubation시키고 1 M Tris(pH 10.6) 10 μl와 alkaline phosphatase(0.1 unit/μl) 10 μl를 가해 37°C에서 1시간 incubation시켰다. 2.9 M acetic acid 10 μl를 가해 0.2 μm filter로 여과하여 이를 calf thymus DNA에서 방법과 동일한 조건으로 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH₂'dG)과 2'-deoxyguanosine을 동시에 분리정량하고 결과치를 나타내었다.

Single cell gel electrophoresis (Comet assay)

CHL cell 5×10⁴개를 24-well에 심고 24시간 후에 검체인 vit-E 또는 galangin을 농도별로 가해 12시간 처리하고(pre-treatment법) 소정의 최종농도가 되도록 양성대조물질인 H₂O₂와 FeCl₂를 처리하였다. 30분 후 trypsin 2 ml를 넣어 세포를 수확하여 시험관에 취했다. 다음 1500 rpm으로 원심분리 후 PBS(without Cl⁻, Mg²⁺)로 세척하고 다시 1500 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 버리고 각각에 0.5%-LMPA(low melting point agarose)를 200 μl 가해준 뒤 vortex로 각각 10초 동안 섞었다. 0.65%-NMPA(normal melting point agarose) 100 μl를 미리 입힌 slide(fully frosted)에 이 액 50 μl를 떨어뜨린 후 커버슬라이드로 덮었다. 냉장고에서 약 15분간 굳힌 뒤 커버슬라이드를 제거하고 그 위에 다시 0.5%-LMPA를 100 μl 떨어뜨린 후 cover slide로 덮고 냉장고에서 15분간 굳혔다. 커버슬라이드를 제거한 후 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% triton X-100)에 담가서 약 1시간 동안 lysis시켰다. 그 후 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13)에 20분간 담가 정치하였다. 전기영동장치에 slide를 양극쪽으로 배열한 뒤 25 V, 300 mA에서 15분간 electrophoresis하였다. 슬라이드를 꺼내 10분씩 3번 0.4 M Tris(pH 7.5)에 담가 중화하였다. Tray에 걸쳐 충분히(15분) 건조시킨 후 ethidium bromide(2 μg/ml)를 20 μl씩 각각에 떨어뜨려 염색한 후 515~560 nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier

filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰하였다. 이때 관찰은 image analyzer인 KOMET 3.1(Kinetic Imaging, England)를 사용하여 분석하였다.¹³⁾ 데이터는 tail length(TL)와 olive tail moment(% tail DNA x distance between head and center of gravity of DNA in the tail, OTM)으로 나타내었다.¹⁴⁾

통계처리

모든 data는 3회 실시하여 student's t-test를 이용하여 통계 처리 하였다.

실험결과

Calf thymus DNA에서 8-OH2'dG 생성에 미치는 영향

Fig. 2에 10⁻³M H₂O₂의 Fe²⁺ 이온 농도에 따른 8-OH2'dG 생성율(8-OH2'dG/10⁵ 2'dG)을 나타내었다. 10⁻³M H₂O₂ 단독처리 시 8.6을 나타내었으며 Fe²⁺ 이온 농도 10⁻⁵M, 10⁻⁴M, 10⁻³M 처리시에 12.9, 34.7, 255.6의 유의성 있는 농도 의존적 증가를 나타내었다. 한편 Table I에 H₂O₂(10⁻³M)/FeCl₂(10⁻³M) 유도 8-OH2'dG 생성에 대한 vit-E와 galangin의 효과를 나타내었다.

전처리(pre-treatment)법에서 vit-E는 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M 농도에서 모두 양성대조군의 생성율 112.0 보다 낮은 생성율을 나타내어 억제효과를 보였으나 농도의존적 경향을 잘 나타내지는 않았다. 생성억제율은 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 각각 18.1%, 15.6%, 16.5%였다. 한편, galangin은 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 95.7, 78.4, 68.4의 생성율을 나타내어 처리농도에 따라 억제경향을 나타내었다. 생성억제율은 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 각각 14.6%, 29.9%(p<0.05), 38.9%(p<0.01)로서 vit-E 보다 높은 억제활성을 나타내었다.

동시처리(simultaneous treatment)법에서 vit-E는 10⁻⁴M(억제율 3.0%)를 제외하고는 양성대조군의 생성율 322.2 보다 오히려 다소 높은 생성율을 나타내어 억제효과를 나타내지 않았다. 한편, galangin은 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 8-OH2'dG 생성률이 각각 331.0, 303.5, 271.7을 나타내어 처리농도에 따라 억제경향을 나

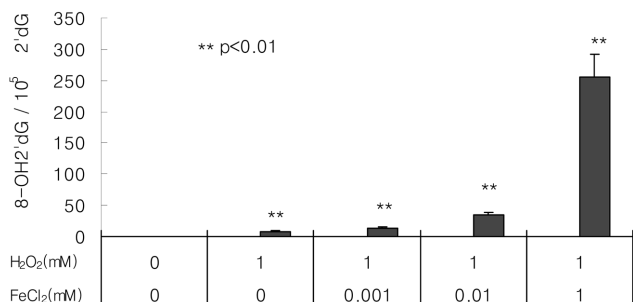


Fig. 2 – The effect of Fe(II) ion on the formation of 8-OH2'dG by H₂O₂ in calf thymus DNA.

Table I – The effect of vit-E and galangin against oxidative DNA damage in the 8-OH2'dG formation of calf thymus DNA by H₂O₂ (10⁻³M) and FeCl₂ (10⁻³M)

Treatment (M)	8-OH ₂ 'dG/10 ⁵ 2'dG (Mean±S.D.)	
	Pre-treatment (% Inh)	Simultaneous treatment (% Inh)
Positive	112.0±19.3	322.2±30.9
Vit-E	10 ⁻⁶	91.7±8.3 (18.1)
	10 ⁻⁵	94.6±13.1 (15.6)
	10 ⁻⁴	93.5±27.3 (16.5)
Galangin	10 ⁻⁶	95.7±14.9 (14.6)
	10 ⁻⁵	78.5±14.0* (29.9)
	10 ⁻⁴	68.4±9.6** (38.9)

n=3, Significant values were * P<0.05 and ** P<0.01 for the effect of antioxidants compared with positive control (Student's t-test). All the reactions contained 100 µg of calf thymus DNA. Other experimental conditions were as described in materials and methods section. Percent inhibition by antioxidants is given in parentheses.

타내었다. 생성억제율은 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 각각 -2.7%, 5.8%, 15.7%로서 vit-E 보다 높은 억제활성을 나타내었다. 동시 처리법이 전처리법 보다 양성물질 노출시간(각각 3시간30분, 30분)이 길기 때문에 양성대조군의 생성률이 높았지만 8-OH2'dG 생성억제효과는 동시처리법에서보다 전처리법에서 더 잘 나타났다.

CHL 세포에서 8-OH2'dG 생성에 미치는 영향

Fig. 3에 CHL cell에서 10⁻³M H₂O₂의 Fe²⁺ 이온 농도에 따른 8-OH2'dG 생성률(8-OH2'dG/10⁵ 2'-dG)을 나타내었다. Fe²⁺ 이온 농도 0 M, 10⁻³M에서 각각 21.9(p<0.01), 110.1(p<0.01)의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 한편 Table II에 H₂O₂ (10⁻³M)/FeCl₂(10⁻³M) 유도 8-OH2'dG 생성에 대한 vit-E와 galangin의 효과를 나타내었다.

Vit-E는 10⁻⁶M(억제율 3.4%)을 제외하고 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 양성대조군의 8-OH2'dG 생성률(8-OH2'dG/10⁵ 2'-dG)인 110.1 보다 유의성 있는 낮은 생성률을 나타내지 못했다. 한편, galangin은 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 각각 69.5, 75.5, 75.3의 8-

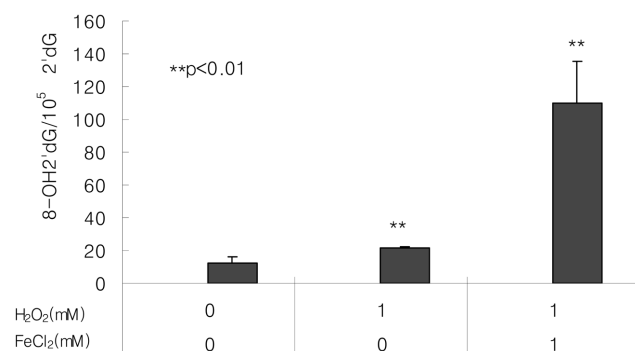


Fig. 3 – The effect of H₂O₂ and FeCl₂ on the formation of 8-OH2'dG in CHL cell.

Table II – The effect of vit-E and galangin on the formation of 8-OH2'dG in CHL cell by H₂O₂ (10⁻³ M) and FeCl₂ (10⁻³ M)

Treatment (M)	8-OH2'dG/10 ⁵ 2'dG (Mean±S.D.)	% Inhibition
Positive	110.1±25.1	
Vit-E 10 ⁻⁶	106.4±28.5	3.4
10 ⁻⁵	129.6±41.5	-
10 ⁻⁴	130.3±26.0	-
Galangin 10 ⁻⁶	69.5±4.9*	36.7
10 ⁻⁵	75.5±17.0	31.4
10 ⁻⁴	75.3±12.8	31.6

n=3, Significant values were * P<0.05 and ** P<0.01 for the effect of antioxidants compared with positive control (Student's t-test). Cells were pre-treated with antioxidants for 12 hrs and then incubated with H₂O₂ (10⁻³M)/FeCl₂ (10⁻³M) for 30 min. Other experimental conditions were as described in materials and methods section.

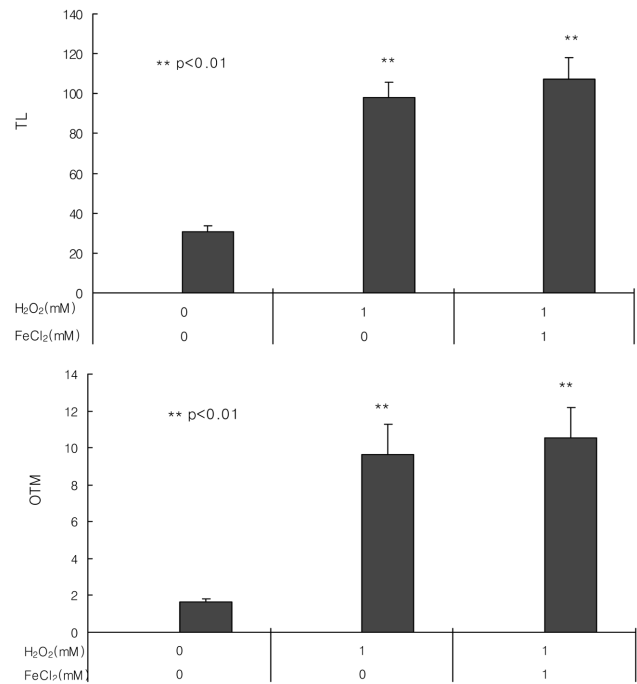
OH2'dG 생성물을 나타내어 처리용량 모두에서 억제효과를 나타내었다. 생성억제율은 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M에서 각각 36.7% (p<0.05), 31.4%, 31.6%로서 농도의존적인 경향은 잘 나타나지 않았으나 vit-E 보다 높은 억제활성을 나타내었다.

CHL cell에서 single strand break에 미치는 영향

Fig. 4에 10⁻³M H₂O₂의 Fe²⁺ 이온 농도에 따른 TL과 OTM을 나타내었다. Fe²⁺ 농도 0 M, 10⁻³M에서 TL이 98.2, 107.4를 나타내었으며, OTM이 9.7, 11.5로서 두 개의 파라미터 모두에서 유의성 있는 증가를 나타내었다. 또한, 10⁻³M H₂O₂에 10⁻³M Fe²⁺ 처리시 10⁻³M H₂O₂ 단독처리보다 DNA 손상도가 상호간 비교할 때도 높아졌다.

Table III에 H₂O₂(10⁻³M)/FeCl₂(10⁻³M) 유도 DNA 손상에 대한 vit-E와 galangin의 억제효과를 TL과 OTM으로 나타내었다. TL에서는 vit-E는 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 모두 양성대조군의 생성을 107.4보다 비슷하거나 낮은 생성물을 나타내는 억제효과를 나타내었다. 한편, galangin은 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 91.8, 79.1, 68.6의 생성물을 나타내어 처리농도에 따라 억제경향을 나타내었다. 생성억제율은 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M에서 각각 14.2%, 26.4%(p<0.05), 36.1%(p<0.01)로서 vit-E 보다 높은 억제활성을 나타내었다.

OTM에서는 vit-E는 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M에서 각각 13.0, 7.5, 7.0을 나타내어 10⁻⁵M과 10⁻⁴M에서 양성대조군 12.5에 비하여 낮은 생성물을 나타내어 억제효과를 나타내었으며 처리농도에 따라 억제경향을 나타내었다. 억제율은 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M에서 -4.0%, 40.0%(p<0.05), 44.0%(p<0.01)였다. 한편, galangin은 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M에서 8.8, 5.7, 5.5의 생성물을 나타내어 처리농도에 따라 억제경향을 나타내었으며, 억제율은 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M에서 각각 29.6%, 54.4%(p<0.05), 56.0%(p<0.01)로서 vit-E 보다 높은 억제활성을 나타내었다. Vit-E와 galangin

**Fig. 4** – The effect of H₂O₂ and FeCl₂ on DNA damage in CHL cell by Comet assay.**Table III** – The effect of vit-E and galangin on the on DNA damage by H₂O₂ (10⁻³ M) and FeCl₂ (10⁻³ M) in the Comet assay

Treatment (M)	TL mean±SD	(% Inh)	OTM mean±SD	(% Inh)
Positive	107.4±10.4		12.5±1.7	
Vit-E 10 ⁻⁶	113.9±10.6	(-6.1)	13.0±2.4	(-4.0)
10 ⁻⁵	75.2±21.4	(30.0)	7.5±2.0*	(40.0)
10 ⁻⁴	70.6±6.0**	(34.3)	7.0±11.0**	(44.0)
Galangin 10 ⁻⁶	91.8±17.7	(14.2)	8.8±1.6	(29.6)
10 ⁻⁵	79.1±9.9*	(26.4)	5.7±0.4**	(54.4)
10 ⁻⁴	68.6±6.0**	(36.1)	5.5±0.5**	(56.0)

n=3, Significant values were * P<0.05 and ** P<0.01 for the effect of antioxidants compared with positive control (Student's t-test). Cells were pre-treated with antioxidants for 12 hrs and then incubated with H₂O₂ (10⁻³M)/FeCl₂ (10⁻³M) for 30 min. Other experimental conditions were as described in materials and methods section. Percent inhibition by antioxidants is given in parentheses.

처리시 TL과 OTM의 결과로 분석한 억제경향은 비슷하였으나 OTM쪽이 TL보다 억제경향을 더 잘 나타내었다.

고 찰

최근 천연물로부터 oxidative stress에 의한 돌연변이, 염색체 손상으로 비롯된 발암억제제를 찾아내는 연구에 매우 관심이 커지고 있다. Oxidative stress를 일으키는 reactive oxygen species (ROS)가 암과 관련된 DNA 손상을 일으킨다고 알려져 있기 때

문이다.^{15,16} 항산화성이 있는 flavonoid들은 one-electron transfer mechanism을 경유하여 superoxide 이온과 같은 ROS와 소거반응을 한다고 알려져 있다.¹⁷ 또한 rat liver microsome과 mitochondria에서 CCl₄와 NADPH dependent lipid peroxidation에서의 flavonoid의 항산화 효과도 보고된 바 있다.¹⁸

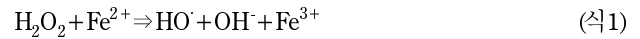
본 연구에서는 산화적 stress에 대하여 보호활성을 갖는 화학 예방요법제(chemopreventive agent)를 창출하기 위하여 양강 (*Alpiniae officinarum rhizoma*)이 주성분¹⁹인 galangin을 가지고 *in vitro* 시험에서 H₂O₂/FeCl₂ 유도 calf thymus DNA 및 CHL cell에서의 8-OH2'dG 생성에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 H₂O₂/FeCl₂ 유도 DNA 손상인 single strand breaks에 미치는 영향도 검토하였다. 상기와 같은 산화성 DNA 손상 바이오마커들의 시험결과 galangin은 강력한 항산화작용을 지닌 것으로 알려진 vit-E보다 억제활성을 더 크게 나타내었다.

그동안 여러 연구를 통하여 galangin의 항박테리아작용,²⁰ 항바이러스작용²¹ 항염증작용²² 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 또한 galangin의 작용기전에 대하여 hepatoma cell에서 anticarcinogenic marker enzyme인 quinone reductase의 활성을 증가시킨다는 것도 보고되어 있다.²³ 또한 galangin은 human breast cancer cell의 증식을 억제하고,²⁴ sulfation induced carcinogenesis를 억제하며²⁵ multidrug-resistant breast cancer cell에서 p-glycoprotein mediated efflux를 증가시켜 증가된 efflux가 DMBA의 burden을 감소시켜 cancer risk를 감소시킨다는 보고도 있다.²⁶ 한편, galangin은 여러 가지 flavonoid 중 가장 LDL의 과산화방지효과가 컸다고 보고하였다.²⁷ 또한 galangin은 CCl₄ 유도 microsomal lipid peroxidation도 강하게 억제시키고 있다고 보고된 바 있다.²⁸ 따라서 지금까지의 galangin의 활성은 항박테리아, 항균, 유전독성억제, 항발암, 항산화작용 등 매우 다양하며 이들이 나타낸 각종 생리활성도 비교적 강한 편으로 보고되어 있다.

H₂O₂와 같은 ROS는 8OH2'dG 생성을 통하여 GC-TA transversion을 포함하는 돌연변이를 DNA에서 일으키며 이 같은 산화적 손상을 받아 노화된 세포에서 돌연변이의 축적이 일어난다.²⁹ 산화적 스트레스에 의해 일어나는 DNA나 염색체 손상 등의 유전독성에 대하여 항산화물질들은 암의 개시, 촉진 및 진전단계에서 항산화반응을 통하여 세포 내 대사의 조절, DNA 반응성 물질들의 차단, DNA 복제나 DNA 수복작용과 같은 기전으로 돌연변이나 염색체 손상 및 발암을 예방할 수 있는 것으로 기대되고 있다.³⁰ 따라서 항산화성이 있는 유전독성억제제의 발견은 산화적 스트레스에 의한 각종 만성 질병의 예방에 효과적인 화학 예방요법제가 될 수 있다고 보여 진다.

Calf thymus DNA는 10⁻³M H₂O₂에 의해 8-OH2'dG를 생성시켰으며 Fe²⁺ 이온 농도 증가에 따라서 8-OH2'dG 생성이 유의성 있는 농도의존적 증가를 나타내었다. 한편 CHL cell에 있어서도

10⁻³M H₂O₂에 의해 8-OH2'dG를 생성시켰으며 Fe²⁺ 이온 첨가 따라 8-OH2'dG 생성이 유의성 있게 증가되었다. H₂O₂에 의한 DNA에서의 8-OH2'dG 생성 대략적인 기전은 다음 식(1), (2)와 같다고 알려져 있다.¹⁰



상기 문헌에 알려진 것처럼 본 실험에서도 calf thymus DNA 및 CHL 세포의 H₂O₂에 의한 DNA 중 8-OH2'dG 생성에 있어 Melidon³¹들의 보고와 같이 Fe²⁺ 이온 농도에 영향을 크게 받고 있었다. 한편, calf thymus DNA에서 H₂O₂(10⁻³M)/FeCl₂(10⁻³M) 유도 8-OH2'dG 생성은 전처리법이 동시처리법보다 양성대조물질 노출시간이 짧아서 DNA 손상은 적게 나타났다. 그러나 vit-E 및 galangin의 전처리법에 따른 억제활성이 동시처리법에서 보다는 잘 나타났다. 그러나 galangin은 전처리법 및 동시처리법 모두에서 vit-E 보다 8-OH2'dG 생성억제활성이 크게 나타났다. 따라서 향후 세포를 이용한 시험에서는 전처리법으로 시험하였다.

CHL 세포를 이용한 실험에서는 H₂O₂(10⁻³M)/FeCl₂(10⁻³M) 유도 8-OH2'dG 생성에서 vit-E는 10⁻⁶M~10⁻⁴M 농도에서 활성이 거의 나타나지 않았으나 galangin의 경우에는 동일처리 농도 범위에서 30% 이상의 억제활성을 나타내었다. Calf thymus DNA를 이용한 시험과 CHL을 사용한 시험에서의 결과 차이는 같은 *in vitro* 시험계이지만 calf thymus DNA가 살아있는 cell line에 서보다는 작용기전이 직접적이기 때문일 것으로 판단된다. 한편 CHL 세포에서 DNA single strand breakage를 검출할 수 있는 comet assay로 실시하였다. Comet assay는 여러 가지 작용기전의 유전독성물질에 의한 단일 세포에서의 DNA 손상을 검출할 수 있는 예민한 방법으로 알려져 있다.³² 본 실험결과에서 CHL cell에 있어서도 10⁻³M H₂O₂에 의해 DNA 손상(TL, OTM)을 생성시켰으며 Fe²⁺ 이온 농도증가에 따라 유의성 있게 증가되었다.

H₂O₂는 사람 임파구,³³ 사람 keratinocyte,³⁴ 사람 jurkat cell,³⁵ 흰쥐 hepatocyte³⁶를 이용한 여러 comet assay에서 양성 반응을 나타내었다고 보고되어 있다. H₂O₂의 DNA 손상에 대한 vit-E, galangin의 효과를 TL과 OTM으로 비교해본 결과 처리농도 10⁻⁶~10⁻⁴M에서 vit-E와 galangin 모두 억제활성을 나타내었으나 galangin이 vit-E 보다 높은 억제활성을 나타내었다.

상기 실험결과를 종합해보면 *in vitro* 수준의 calf thymus DNA와 mammalian cell에서의 DNA 산화에 미치는 손상을 galangin이 효과적으로 억제해주고 있는 것으로 나타났다. 한편 Comet 시험의 파라미터들이 8-OH2'dG 바이오마커보다 예민한 시험결과를 보여주었다. 한편, quercetin과 myricetin³⁷ 또는 vitamin C³⁸가 H₂O₂ 유도 DNA strand breakage를 억제하였다고 보고한 바 있다. 또한, 여러 가지 polyphenol류와 flavonoid 화합물들

이 다양한 항산화작용으로 세포 내 oxidative stress를 감소시킨다고 알려져 있다.³⁹⁻⁴⁴⁾ 따라서 적어도 본 연구의 시험조건하에서 H₂O₂/FeCl₂ 유도 DNA 손상을 억제하는 galangin과 vit-E 등 항산화제들은 H₂O₂에 의해 생성된 hydroxy 및 peroxy radical 같은 ROS를 소거하고 산화적 유전자 손상에 대한 항산화성 보호작용을 하고 있다고 보여진다. 그러나 flavonoid가 Fe²⁺를 킬레이트함으로써 Fenton reaction을 억제하고 결과적으로 ROS생성을 감소시키며 이에 따라 oxidative DNA 손상억제를 나타내는 것도 배제할 수는 없다⁴⁵⁾ 이같은 galangin의 DNA의 8-OH2'dG 부가체 생성감소 및 single stand breaks 생성감소와 같은 항산화적 유전자 손상억제효과는 galangin의 항산화작용 때문인 것으로 판단된다.

결 론

Galangin은 산화적 stress에 의한 calf thymus DNA 및 CHL 세포에서의 8-OH2'dG의 생성에 있어서 양호한 억제효과를 나타내었다. Galangin은 Comet assay를 활용한 CHL 세포에 미치는 H₂O₂ 유도 DNA strand 절단에 있어서도 양호한 억제효과를 나타내었다. 따라서 galangin은 H₂O₂/Fe²⁺ 유도 8-OH2'dG 생성억제효과와 DNA strand 절단 억제효과로 보아 산화적 스트레스에 대한 항산화작용을 갖는 유전독성억제 화학예방요법제 (antioxidative antigenotoxic chemopreventive agent)로서 유용하다고 판단되어진다.

감사의 말씀

본 연구논문은 강원대학교 종합약학연구소의 장비지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ames, B. N. : Endogeneous DNA damage as related to cancer and aging, *Mutation Res.* **214**, 41 (1989).
- Farooqui, T. and Farooqui, A. A. : Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 203 (2009).
- Chance, B., Siers, H. and Boveris, A. : Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Phys. Rev.* **59**, 527 (1979).
- Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjonneland, A., Overvad, K. and Poulsen, H. E. : Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* **13**(12), 2241 (1992).
- Douglas, R. M., Ian, N. A., Lindsay, M. and Robert, A. F. : A

- sensitive and selective method for the determination of tissue 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using HPLC with electrochemical array detection. *ESA Inc.* (1997).
- Park, J. W., Cundy, K. C. and Ames, B. N. : Detection of DNA adducts high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis* **10**, 827 (1989).
- Kaneko, T., Tahara, S. and Matsuo, M. : Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat. Res.* **316**, 277 (1996).
- Shigenaga, M. K., Park, J. W., Cundy, K. C., Gimeno, C. J. and Ames, B. N. : *In vivo* oxidative DNA damage: Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol.* **186**, 521 (1990).
- Collins, A. R., Dusinska, M., Gedik, C. M. and Stetina, R. : Oxidative damage to DNA : do we have a reliable biomarker ?, *Environ Health Perspect.* **104** Suppl **3**, 465 (1996).
- Muniz, P., Valls, V., Perez-Brostta, C., Iradi, A., Climent, J. V., Oliva, M. R. and Saez, G. T. : The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine* **18**, 747 (1995).
- Toru, T. and Kanehisa, M. : Increased formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, an oxidative DNA damage, in lymphoblasts from Fanconi's anemia patients due to possible catalase deficiency. *Carcinogenesis* **14**, 1115 (1993).
- Paul, H. G., Douglas, R. Mc., Hasan, P., Simone, P. and Ian, N. A. : The measurement of markers of oxidative damage, antioxidant and related compounds using HPLC and coulometric array analysis. *Progress in HPLC-HPCE* **6**, 99 (1997).
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. : A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **175**, 184 (1988).
- Olive, P. L., Banath, R. E. and Durand, R. E. : Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat. Res.* **122**, 86 (1990).
- Floyd, R. A. : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* **4**, 2578 (1990).
- Halliwell, B. and Aruoma, O. I. : DNA damage by oxygen-derived species; its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letter* **281**, 9 (1991).
- Afanas'ev, I. B. and Polozovam N. I. : One electron oxidation of p- and o-dihydroxy benzenes by oxygen radical anion in aprotic medium. *Zh. Organ. Khim.* **26**, 1013 (1978).
- Slater, T. F. and Scott, R. : The free radical scavenging action of (+) cyanidanol-3 in relation to the toxicity of carbon tetrachloride. *Int. Congr. Symp. Ser-R Soc. Med.* **47**, 33 (1981).
- The encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese

- Medicine), Hoikusa, Japan, pp. 136-137 (1993).
- 20) Afolayan, A. J. and Meyer, J. J. : The antimicrobial activity of 3,5,7-tri-hydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysu aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* **57**, 177 (1997).
 - 21) Meyer, J. J., Afolayan, A. J., Taylor, M. B. and Erasmus, D. : Antiviral activity of galangin isolated from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* **56**, 165 (1997).
 - 22) Krol, W., Scheller, S., Czuba, Z., Matsuno, T., Zydowicz, G., Shan, J. and Kos, M. : Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *J. Ethnopharmacol.* **55**, 19 (1996).
 - 23) Uda, Y., Price, K. R., Williamson, G. and Rhodes, M. J. : Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. *Cancer Lett.* **120**, 213 (1997).
 - 24) So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F. and Carroll, K. K. : Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett.* **112**, 127 (1997).
 - 25) Eaton, E. A., Walle, U. K., Lewis, A. J., Hudson, T., Wilson, A. A. and Walle, T. : Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 232 (1996).
 - 26) Phang, J. M., Poore, C. M., Lopaczynska, J. and Yeh, G. C. : Flavonol-stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in multidrug resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* **53**, 5977 (1993).
 - 27) Myara, I., Pico, I., Védie, B. and Moatti, N. : A method to screen for the antioxidant effect of compounds on low-density lipoprotein (LDL): illustration with flavonoids. *J. Pharmacol Toxicol Methods* **30**, 69 (1993).
 - 28) Cholbi, M. R., Paya, M. and Alcaraz, M. J. : Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* **47**, 195 (1991).
 - 29) Ames, B. N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science* **221**, 1256 (1983).
 - 30) Flora, S., Bronzetti, G. and Sovels, F. H. : Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Mutat. Res.* **267**, 153 (1992).
 - 31) Melidou, M., Riganakos, K. and Galaris, D. : Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. *Free Radical Biology and Medicine* **39**, 1591 (2005).
 - 32) Collins, A. R. : The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* **26**(3), 249 (2004).
 - 33) Wyatt, N., Kelly, C., Fontana, V., Merlo, D. F., Whitelaw, D. and Anderson, D. : The responses of lymphocytes from Asian and Caucasian diabetic patients and non-diabetics to hydrogen peroxide and sodium nitrite in the Comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **609**(2), 154 (2006).
 - 34) Petersen, A. B., Gniadecki, R., Vicanova, J., Thorn, T. and Wulf, H. C. : Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **59**, 123 (2000).
 - 35) Barbouti, A., Doulias, B. T., Nouis, L., Tenopoulou, M. and Galaris, D. : DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine* **33**(5), 691 (2002).
 - 36) Horváthová, E., Slameňová, D., Maršálková, L., Šramková, M. and Wsóllová, L. : Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. *Food and Chemical Toxicology* **47**(6), 1318 (2009).
 - 37) Duthie, S. J., Collins, A. R., Duthie, G. G. and Dobson V. L. : Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **393**(3), 223 (1997).
 - 38) Arranz, N., Haza, A. I., García, A., Delgado, E., Rafter, J. and Morales, P. : Effects of organosulfurs, isothiocyanates and vitamin C towards hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in human hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions* **169**, 63 (2007).
 - 39) Lee, S. C., Shin, K. S. and Heo, M. Y. : Protection of ROS induced cytotoxicity and DNA damage by the extract of *Alpinia officinarum*. *J. Food Hygiene and Safety* **17**, 106 (2002).
 - 40) 이승철, 허찬, 이승현, 김현표, 허문영 : 야채 및 과일추출물의 항산화작용과 산화적 염색체손상에 대한 억제효과. *약학회지* **48**(2), 111 (2004).
 - 41) MacGregor, J. T. : Genetic toxicology of dietary flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* **213**, 33 (1986).
 - 42) Hatcher, J. F. and Bryan, J. T. : Factors affecting the mutagenic activity of quercetin for *Salmonella typhimurium* TA98: metal ions, antioxidants, and pH. *Mutation Res.* **148**, 13 (1985).
 - 43) Stich, H. F., Karim, J., Koropatnick, J. and Lo, L. : Mutagenic action of ascorbic acid. *Nature* **260**, 722 (1976).
 - 44) Gutteridge, J. C. M. and Xaio Chang, F. : Enhancement of bleomycin-iron free radical damage to DNA by antioxidants and their inhibition of lipid peroxidation. *FEBS Letter* **123**, 71 (1981).
 - 45) Melidou, M., Riganakos, K. and Galaris, D. : Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. *Free Radic Biol Med.* **39**(12), 1591 (2005).