

## 팥(*Phaseolus angularis*) 열수 추출물의 산화적 DNA와 세포 손상 억제 효과

박영미, 정진부<sup>1</sup>, 서주희<sup>2</sup>, 임재환, 정형진<sup>1</sup>, 서울원\*

안동대학교 자연과학대학 생명과학과, <sup>1</sup>안동대학교 자연과학대학 생약자원학과, <sup>2</sup>국립중앙의료원 한방신경정신과

## Inhibitory Effect of Red Bean (*Phaseolus angularis*) Hot Water Extracts on Oxidative DNA and Cell Damage

Young Mi Park, Jin Boo Jeong<sup>1</sup>, Joo Hee Seo<sup>2</sup>, Jae Hwan Lim, Hyung Jin Jeong<sup>1</sup> and Eul Won Seo\*

Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Medicinal Plant Resource, Andong National University, Andong 760-749, Korea

<sup>2</sup>Korean Neuropsychiatry, National Medical Center, Seoul 100-799, Korea

**Abstract** - In this study, we evaluated the protective effects of the hot water extract from red bean (*Phaseolus angularis*) against oxidative DNA and cell damage induced by hydroxyl radical. The antioxidant activities were evaluated by hydroxyl radical and hydrogen peroxide scavenging assay, and Fe<sup>2+</sup>-chelating assay. Although the extract with hot water didn't scavenge the hydroxyl radical, it removed and chelated hydrogen peroxide and ferrous iron necessary for the induction of hydroxyl radical by 71% and 64% at 200 µg/ml, respectively. Its protective effect on oxidative DNA damage was carried using ψX-174 RF I plasmid DNA comparing the conversion level of supercoiled form of the plasmid DNA into open-circular form and linear form and the expression level of phospho-H2AX in NIH 3T3 cells. In ψX-174 RF I plasmid DNA cleavage assay, it inhibited oxidative DNA damage by 96% at 200 µg/ml. Also, it decreased the expression of phospho-H2AX by 50.1% at 200 µg/ml. Its protective effect against oxidative cell damage was measured by MTT assay and the expression level of p21 protein in NIH 3T3 cells. In MTT assay for the protective effect against the oxidative cell damage, it inhibited the oxidative cell death and the abnormal cell growth induced by hydroxyl radical. Also, it inhibited p21 protein expression by 98% at 200 µg/ml. In conclusion, the results of the present studies indicate that hot water extract from red bean exhibits antioxidant properties and inhibit oxidative DNA damage and the cell death caused by hydroxyl radical.

**Key words** - Antioxidant activities, Hydroxyl radical, Hydrogen peroxide, Reactive oxygen species

## 서 언

호기성 생물체들은 공기 중의 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지를 생성하는데(Gutteridge and Halliwell, 1994), 이 때 생성되는 산화적 대사 부산물인 활성산소는 세포 내 여러 구성성분인 지질, 단백질, 핵산 및 DNA를 산화시켜 노화 및 다양한 퇴행성 질환을 유발하기도 하며(Park *et al.*, 2003), 세포 내 여러 조직을 손상시키며 많은 퇴행성 질환, 즉 암, 노화, 동맥경화, 류마티스 관절염

및 알레르기를 유발하기도 한다(Balavoine and Genletii, 1999). 또한 생체 내 활성산소는 DNA를 분절시킴으로 DNA의 유전정보에 손상을 주는 유전독성의 원인이 되어 생체 기능을 저하시킨다(Valko *et al.*, 2007). 그러나 생체에 존재하는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등과 같은 항산화효소는 세포 활동 중 생성되는 활성산소의 유리기를 제거함으로써 산화-항산화의 균형을 유지시켜 줌으로서 산화적 스트레스로부터 생체를 보호하고 있다(Ji, 1993). 이 외에도 활성산소를 소거할 수 있는 화합물 또는 과산화물 생성 억제 물질과 같은 항산화

\*교신저자(E-mail) : ewseo@andong.ac.kr

제들은 활성산소로 인한 산화적 손상으로부터 세포를 보호함으로써 산화스트레스에 의해 유발되는 질병의 예방 또는 치료 효과를 나타내고 있다(Kim *et al.*, 2005). 그러나 현대인은 흡연, 각종 환경오염물질, 알코올, 약물, 방사선, 격렬한 운동 등 물리, 화학적 요인들에 의해 발생하는 체내 활성 산소종의 생성과다로 산화적 스트레스에 시달리고 있다(Wickens, 2001).

최근 전통한약 및 천연물로부터 기능성식품의 개발을 위하여 항산화, 고혈압, 당뇨병, 비만, 면역활성강화, 암 예방 및 항 노화에 효능이 있는 생리활성 물질에 대한 연구가 집중되고 있으며 대체의학분야에서 항산화제가 중요한 기능성 바이오 소재로 각광 받고 있다(Raju and Mehta, 2009; Sirtori *et al.*, 2009). 따라서 활성산소를 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되어 효소계열의 예방적 항산화제인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등과 천연 항산화제인 tocopherol, 비타민 C, carotechin, glutathione 및 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), trolox-C를 포함한 많은 항산화제가 개발되어 연구 보고되었다(Hatano, 1995; Masaki *et al.*, 1995). 그러나 합성 항산화제인 BHA와 BHT는 항산화 효과가 뛰어난 반면 과량 섭취 시 심각한 병을 유발할 수 있는 것으로 알려지면서(Seog *et al.*, 2002), 보다 안전하고 효력이 강한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있어 각종 천연 항산화성 물질에 관한 많은 연구가 필요한 실정이다.

본 연구의 소재인 팥은 우리나라에서 콩 다음으로 수요가 많은 두류로, 단백질과 지방질 함량이 낮고 탄수화물 함량이 높아 그 구성성분의 대부분은 전분으로 이루어져 있다(Koh *et al.*, 1997). 팥에는 쌀의 소화에 반드시 필요한 비타민 B1이 다량 함유되어 있으므로 밥밑콩의 형태로 많이 이용되고 있으며, 팥죽이나 떡, 빵, 과자 등의 속재료 뿐만 아니라 최근에는 양갱과 양갱, 빙과제조용으로도 많이 사용되고 있다. 팥에 대한 연구는 비린내 발생 원인인 peroxidase와 전분의 gel 형성 특성측면에서 이루어져 왔으며, 팥 단백질에 대한 보고(Kim *et al.*, 1990; Meng and Ma, 2001)가 있다. 또한 팥 껍질의 색소에 관한 연구(Yoshida *et al.*, 1996)와 팥의 수화속도에 관한 보고(Abu-Ghannam, 1998) 등이 있다

최근의 질병양상이 영양결핍보다는 항산화능과 관련된

만성질환이 주를 이룸에 따라 대두를 비롯한 각종 식물로부터 여러 생리활성 물질의 활성탐구 및 추출에 많은 노력이 이루어지고 있으나, 대두와 같은 두류로 분류되는 팥의 경우 이들 생리활성물질에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다(Oh *et al.*, 2003). 본 연구에서는 팥 유래 천연 성분의 고기능성 소재 활용을 위한 생화학 및 분자적 차원의 작용기전을 규명하고자 팥 열수 추출물의 항산화능 및 산화적으로 손상을 받는 DNA와 세포에 대한 억제 효과에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

본 연구에 사용한 팥(*Phaseolus angularis*)은 경북 안동시 농협에서 구입하여 사용하였다. NIH 3T3 세포는 한국세포주은행(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양받았고, 세포의 배양을 위해 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)와 fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS) 등은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.  $\Psi$ X-174 RF I plasmid는 New England BioLabs(County Road Ipswich, MA)에서 구입하였고, Western-blot에 사용된 Anti-body는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, USA)에서 구입하였다. 그 외에 실험에 사용된 용매 및 시약은 특급을 사용하였다.

### 팥의 열수 추출

건조된 팥 400 g에 4000 ml의 물을 가한 다음 4시간 열수 추출하여 착즙 하지 않고 체로 여과하여 사용하였다. 여과된 추출물은 15,000 rpm으로 30분간 원심분리 후 상등액만을 취하여 동결건조 하였다. 건조된 시료는 냉동 보관 후 시료로 사용하였다.

### 팥 열수 추출물의 항산화 활성

DPPH 라디칼 소거능은 Hsu 등(2006)의 방법을 이용하여 조사하였다. 농도별 sample(DMSO에 4 mg/ml로 희석)과 300  $\mu$ M DPPH 에탄올을 30분간 반응한 후 추출물의 농도에 따라 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 따른 DPPH 소거능은 DMSO 처리 대조군과 비교하여 DPPH 라디칼을 소거하는 시료의 농도로 계산하였다.

Hydroxyl 라디칼 소거활성은 Smirnof와 Cumbes(1989)의 방법에 따라 측정하였다. 1.5 mM의 FeSO<sub>4</sub>, 6 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 mM의 sodium salicylate 및 농도별 sample을 37°C에서 약 30분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hydrogen peroxide 소거능은 Pick와 Keisari(1980)의 방법에 준하여 실시하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS radical을 형성시킨 후, 732 nm에서 흡광도 값이 1.4-1.5가 되도록 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 950 µl에 시료를 농도별로 50 µl씩 첨가한 후 10분 후에 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fe<sup>2+</sup>-chelating 활성은 Hsu 등(2006)의 방법에 따라 측정하였다. 2 mM의 FeCl<sub>2</sub> 15 µl와 150 µl의 농도별 sample, 605 µl의 증류수를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응하였다. 반응 시킨 시료는 5 mM ferrozine 30 µl 넣고 혼합한 후 Fe<sup>2+</sup>-ferrozine 혼합액의 흡광도를 562 nm에서 측정하였다.

Hydroxyl 라디칼과 hydrogen peroxide 소거능 및 Fe<sup>2+</sup>-chelating 활성은 증류수를 처리한 대조군과 비교하여 계산하였다.

### 팔 열수 추출물의 산화적 DNA 및 세포 손상 억제력

팔 열수 추출물의 산화적 DNA 손상 억제력을 조사하기 위하여 우선 팔 열수 추출물이 ΨX-174 RF I plasmid DNA 손상에 미치는 영향을 조사하였다. ΨX-174 RF I plasmid DNA와 농도별 시료를 처리하여 hydroxyl 라디칼과 혼합하였다. 혼합한 시료는 37°C에서 30분 동안 반응 시킨 후, 50% glycerol(v/v), 40 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue을 첨가하여 reaction stop buffer를 만들어 1% agarose gel로 전기영동 후 분석하였다.

H2AX 단백질 발현 확인을 확인하기 위하여 sample을 처리한 NIH 3T3 세포로부터 lysis buffer(50 mM tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] and 1 mM DTT)를 이용하여 단백질을 추출하여 PVDF membrane에 transfer 하였다. transfer 후 membrane에 H2AX antibody와 dilution buffer(5% BSA, 1×TBST)를 1:1000으로 하여 4°C에서

반응시킨 후 2차 HRP-linked antibody를 처리하여 H2AX 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

DNA migration 분석은 Cho(2008)의 방법에 따라 실시하였다. NIH 3T3 세포(2×10<sup>6</sup> cells/well) 팔 열수 추출물을 처리하고 각각의 처리별 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 상등액을 제거한 후 lysis buffer와 proteinase K를 첨가하여 약 1시간 동안 반응시키고, RNase와 DNA sample buffer를 첨가하여 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

팔 열수 추출물의 산화적 세포 손상 억제력을 조사하기 위하여 팔 열수 추출물에 대한 MTT 분석을 실시하였다. NIH 3T3 세포(5×10<sup>3</sup> cell/well)은 농도별 시료를 처리하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, hydroxyl 라디칼을 처리하고 50 µl의 MTT solution(1 mg/ml)을 각 well에 넣어 4시간 반응시켰다. 시료는 상등액을 제거한 다음 DMSO를 처리하여 570 nm에서 microplate reader(infinite 200, Austria)로 흡광도를 측정하였다.

Lipid peroxidation 분석은 Kang 등(2008)의 방법에 따라 시행하였다. NIH 3T3 세포(2×10<sup>5</sup> cells/ml)에 시료와 hydroxyl 라디칼을 처리하고 세포는 회수하여 1.15% KCl로 homogenization 시킨 후 0.2 ml sodium dodecyl sulfate(8.1%), 1.5 ml acetic acid(20%, pH 3.5) 그리고 1.5 ml thiobarbituric acid(0.8%)를 첨가하여 고온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 5 ml n-butanol/pyridine mixture(15:1, v/v)로 분획을 통해 얻은 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

p21 단백질의 발현을 확인하기 위하여 시료와 hydroxyl 라디칼을 처리한 NIH 3T3 세포는 trypsin-EDTA로 세포를 회수하여 단백질 정량 후 western-blot 분석 방법에 의해 p21 단백질의 발현을 확인하였다.

### 통계처리

모든 실험은 독립적으로 5회 이상 반복적으로 이루어졌으며 결과에 대한 통계처리는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's t-test를 이용한 후 P값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

### 결과 및 고찰

Hydroxyl radical, hydrogen peroxide 및 superoxide anion 등에 의해서 유발되는 산화적 스트레스는 여러 가지

대사질병과 세포사멸에 중요한 역할을 한다. 세포가 활성 산소에 노출되었을 때 superoxide dismutase, catalase 및 glutathionine peroxidase와 같은 항산화효소가 활성화되어 세포내 산화적 스트레스가 제거된다. 그러나 활성 산소의 발생과 항산화효소의 활성 사이에 균형이 깨지면 염증, 암 발생 및 노화가 가속화되기도 한다(Lightfoot *et al.*, 2006; Looi *et al.*, 2008). 따라서 산화적 스트레스와 관련된 여러 가지 질환을 예방하기 위하여 활성산소의 발생을 감소시키기 위한 천연 생리활성 물질을 개발하려는 것은 중요한 연구분야이다. 따라서 본 연구에서는 팥 열수 추출물 내 천연 성분의 항산화 활성 및 DNA와 세포의 손상 억제 활성을 알아보았다.

### 팥 열수 추출물의 항산화 활성

호기성 생물의 호흡과정으로 체내에 유입된 산소는 대사 과정에서 활성산소를 생성하게 되는데, 이러한 활성산소는 반응성이 매우 크기 때문에 세포막과 단백질의 분해, 지질 과산화, DNA 손상 등 체내 조직 및 기관에 산화적 스트레스를 일으켜 노화와 질병의 발생을 야기한다(McKee and McKee, 2002). 따라서 이러한 산화적 스트레스를 방어하는 항산화능은 호기성 생물의 노화와 질병에 관련되어 매우 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 측면에서 팥 열수 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 추출물의 농도에 따른 DPPH 유리 라디칼 및 hydroxyl 라디칼 제거능을 측정하였다. 팥 열수 추출물의 DPPH 유리 라디칼 제거능은 0.32 µg/ml에서 10.2%, 1.6 µg/ml에서 44.0%, 8 µg/ml에서 52.2%, 40 µg/ml에서 57.6%, 200 µg/ml에서는 65.9%의 유리 라디칼 제거능을 나타내었으며(Fig. 1), hydroxyl 라디칼 제거능의 분석 결과 0.32, 1.6, 8, 40, 200 µg/ml의 농도에서 각 5.0%, 19.3%, 21.8%, 25.7%, 39.1%의 라디칼 제거 활성을 보였다(Fig. 2). Choi 등(2003)은 오미자(*Schizandrae fructus*) 및 황금(*Scutellaria radix*)의 에탄올 추출물의 DPPH 유리 라디칼과 hydroxyl 라디칼의 제거능을 조사한 결과 1000 µg/ml의 농도에서 모두 60% 이상의 활성을 보인다고 시사한 바 있는데, 본 실험에서 팥 열수 추출물의 DPPH 라디칼 제거능은 66%의 활성을 나타내었고, hydroxyl 라디칼의 제거능은 39.1%를 보여 팥 열수 추출물은 체내 대사 과정에서 생성되는 유리 라디칼의 제거에 비교적 효과적으로 작용할 것으로 생각된다.

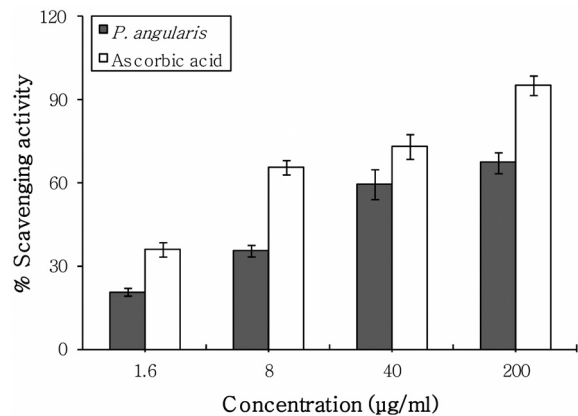


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activities of hot water extracts from *P. angularis*. The absorbance values were converted to scavenging effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging effect (%) against extracts concentration in µg extracts per ml reaction volume. Ascorbic acid was used for the positive control.

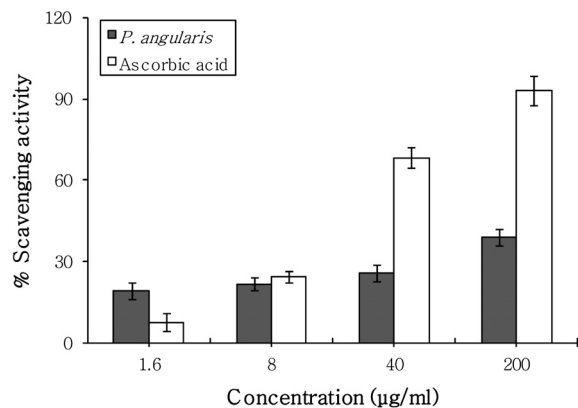


Fig. 2. Hydroxyl radical scavenging activities of hot water extracts from *P. angularis*. The absorbance values were converted to scavenging effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging effect (%) against extracts concentration in µg extracts per ml reaction volume. Ascorbic acid was used for the positive control.

철은 호흡, 산소의 운송 및 다양한 효소의 활성화에 꼭 필요한 성분이지만, Fe<sup>2+</sup>는 체내의 과산화수소에 의한 Fenton 반응으로 hydroxyl 라디칼과 같은 활성산소의 생성을 촉진하여 체내 산화를 야기한다(Kim *et al.*, 2009). 따라서 추출물이 철 이온의 chelating과 과산화수소의 제거에 미치는 영향을 분석하면 유리 라디칼 생성에 대한 억제 효과를 알 수 있다. 본 연구에서 팥 열수 추출물의 Fe<sup>2+</sup>-chelating

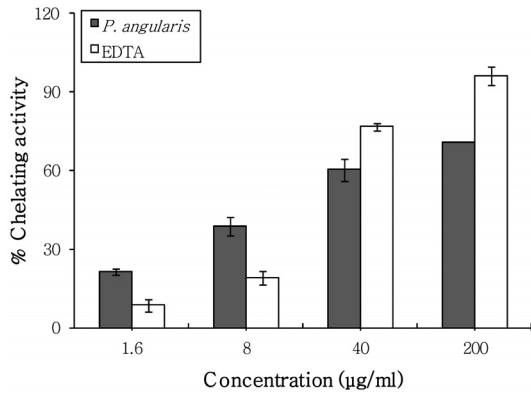


Fig. 3. Fe<sup>2+</sup>-chelating activity of hot water extracts from *P. angularis*. The absorbance values were converted to chelating effects (%) and data plotted as the means of replicate chelating effect (%) against extracts concentration in µg extracts per ml reaction volume. EDTA was used for the positive control.

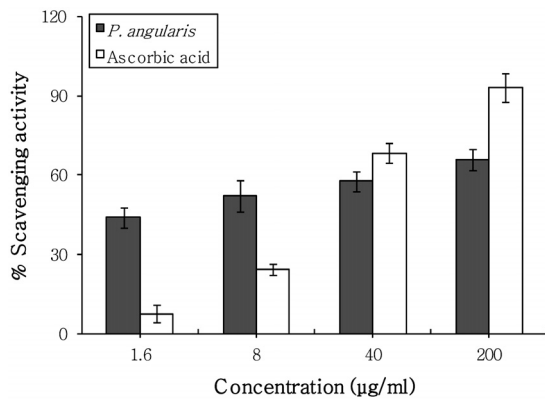


Fig. 4. Hydrogen peroxide scavenging activities of hot water extracts from *P. angularis*. The absorbance values were converted to scavenging effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging effect (%) against extracts concentration in µg extracts per ml reaction volume. Ascorbic acid was used for the positive control.

효과는 0.32 µg/ml에서 4.0%, 1.6 µg/ml에서 21.6%, 8 µg/ml에서 38.8%, 40 µg/ml에서 60.2%, 200 µg/ml에서 71.0%의 효과를 보였으며(Fig. 3), 과산화수소 제거능도 농도가 높아짐에 따라 활성이 증가하여 200 µg/ml의 농도에서 약 67.3%의 제거능이 나타났다(Fig. 4).

흑마늘의 메탄올 추출물은 농도가 높아짐에 따라 과산화수소 제거능이 유의성 있게 증가하여 1000 µg/ml에서 약 80%의 제거 효과를 나타낸다고 한 바 있는데(Lee *et al.*, 2010), 본 연구에서 팔 열수 추출물은 Fe<sup>2+</sup>의 환원 효과와

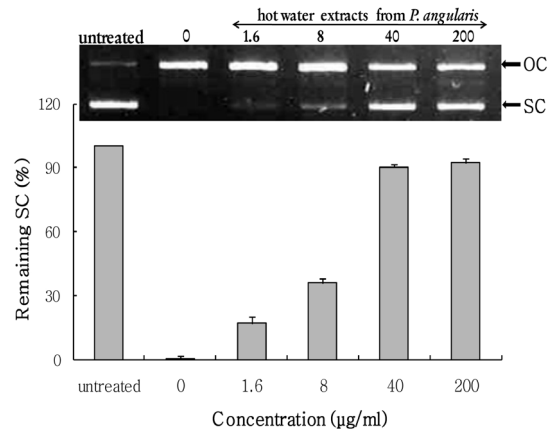


Fig. 5. Oxidative damage of ΨX-174 RF I plasmid DNA caused by hydroxyl radical. In the plot, % supercoiled form remaining were calculated by being compared with the density of the untreated using UN-SCAN-IT program (Silk Scientific, Inc.).

과산화수소 제거능이 높아 체내 라디칼의 생성을 억제하는데 효과적으로 작용하는 것으로 생각된다.

#### 팔 열수 추출물의 산화적 DNA 및 세포 손상 억제력

팔 열수 추출물의 산화적 DNA 손상 억제력을 평가하기 위해 ΨX-174 RF I plasmid DNA를 이용하여 *in vitro* DNA cleavage와 DNA migration 분석을 실시하였다. DNA에 유발된 산화적 손상의 축적은 정상세포를 형질전환 세포로 전환시키는 발암 개시점으로 작용하기 때문에 항산화능에 있어 DNA의 산화적 손상에 대한 억제력은 매우 중요하다(Vuillaume, 1987). 본 연구에서 무처리 대조군의 plasmid DNA는 손상 받지 않은 super coiled(SC) 형태로 확인되었으나, Fe<sup>2+</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 라디칼 처리군에서는 활성산소에 의한 DNA 분절화로 인해 open circular(OC) 형태로 전환되었다. 이러한 조건에서 팔 열수 추출물과 라디칼을 함께 처리한 실험군에서는 SC 형태에서 OC 형태로의 전환을 농도 의존적으로 억제하여 1.6 µg/ml에서 약 16.9%, 8 µg/ml에서 약 36.01%, 40 µg/ml에서 약 90.4%, 그리고 200 µg/ml에서 약 92.3%로 나타났다(Fig. 5).

또한 팔 열수 추출물의 DNA migration을 분석해 보면 DNA tail 이동도는 무처리 대조군에 비해 라디칼 처리군에서 매우 증가되는 경향을 보이지만, 이러한 조건에서 팔 열수 추출물을 농도별로 처리하였을 경우 DNA tail은 농도가 높아짐에 따라 점차적으로 감소하여 고농도에서 무처리 대

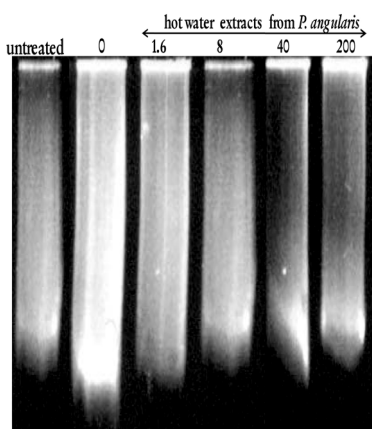


Fig. 6. Intracellular DNA migration assay of NIH 3T3 cells caused by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated and lane 2 is treated with FeSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extracts (1.6, 8, 40 and 200 µg/ml) in presence of hydroxyl radical.

조균과 유사한 이동도를 나타내었다(Fig. 6). 최근 연구에서 천궁(*Cnidium officinale*)의 80% 에탄올 추출물의 경우 1.6, 8, 40, 200 µg/ml의 농도로 NIH 3T3 세포에 처리한 결과 시료의 농도가 높아짐에 따라 DNA tail의 이동도가 감소한다고 보고한 바 있다(Jeong *et al.*, 2009). 본 연구에서도 팥 열수 추출물은 plasmid DNA의 산화적 손상 억제능과 DNA tail 이동도를 감소시키는 것으로 보아 활성 산소에 의한 DNA의 분절화를 억제하는데 효과적으로 작용하는 것으로 생각된다.

팥 열수 추출물이 hydroxyl 라디칼에 의한 DNA의 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 H2AX의 인산화비를 분석하였다. H2AX 인산화는 각종 DNA 손상에 의해 노출된 후 나타나는 단백질로(Rogakou *et al.*, 1998), 본 연구에서 hydroxyl 라디칼을 처리한 세포군에서는 인산화비가 증가하였다. 반면, 팥 열수 추출물을 라디칼과 함께 처리하였을 때 H2AX의 인산화비는 8 µg/ml에서 약 55.2%, 40 µg/ml에서 약 55.8%, 그리고 200 µg/ml에서 약 50.1% 정도로 나타났다(Fig. 7). 최근 Jeong 등(2010)의 연구에 의하면 까마중(*Solanum nigrum* L.)에서 정제한 lunasin 단백질은 DNA에 대한 H2AX의 인산화비 억제율이 10 µM에서 82%로 나타난다고 한 바 있다. 본 연구에서 팥 열수 추출물은 200 µg/ml에서 약 50%의 인산화비 억제율을 보이고 있기 때문에 DNA의 인산화를 비교적 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

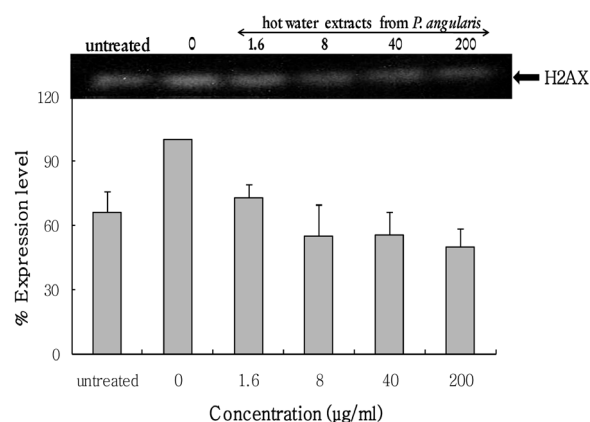


Fig. 7. Expression level of H2AX induced by hydroxyl radical. Lane 1 is untreated and lane 2 is treated with FeSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extracts(1.6, 8, 40 and 200 µg/ml) in presence of hydroxyl radical. In the plot, % expression level were calculated by being compared with the density of the control band (treated with hydroxyl radical) using UN-SCAN-IT program.

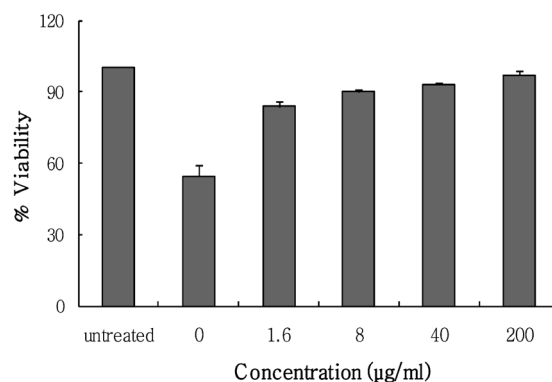


Fig. 8. Effect of the hot water extracts from *P. angularis* on oxidative cell damage induced by hydroxyl radical. The viability of NIH 3T3 cells was evaluated by MTT assay.

팥 열수 추출물이 활성 산소에 의해 야기되는 세포 손상에 미치는 영향을 알아보기 위해 우선 MTT 분석을 통한 팥 추출물의 세포 독성을 확인하였다. NIH 3T3 세포를 대상으로 세포 생존율을 측정된 결과 Fe<sup>2+</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 라디칼 처리군은 무처리 대조군에 비해 세포의 생존율이 54.7%로 급격히 감소하였으나, 팥 열수 추출물과 라디칼을 함께 처리하였을 때에는 200 µg/ml 농도에서 97.0%로 나타나 대조군과 유사한 세포 생존율을 보였다(Fig. 8).

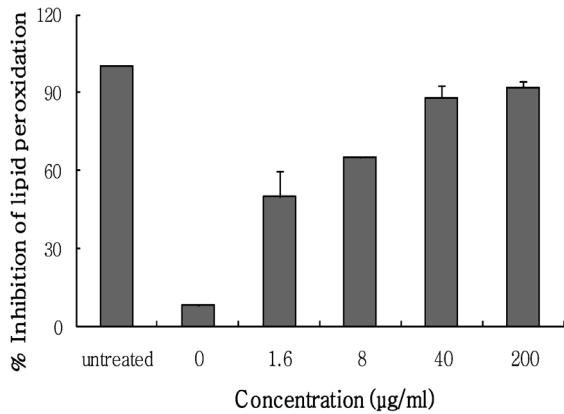


Fig. 9. Effect of hot water extracts from *P. angularis* on oxidative cell damage induced by hydroxyl radical. The inhibition of lipid peroxidation was evaluated by measuring the amount of TBARS formation using NIH 3T3 cells.

이와 더불어 지질과산화 분석을 통하여 팔 열수 추출물이 hydroxyl 라디칼에 의한 과산화물의 생성에 미치는 영향을 조사하여 본 결과, 무처리 대조군에 비하여 라디칼 처리군의 지질과산화 억제 효과는 8.1%의 낮은 수치를 보였다. 반면 이러한 조건에서 팔 열수 추출물의 지질과산화 억제 효과는 1.6 µg/ml에서 50.0%, 8 µg/ml에서 65.4%, 40 µg/ml에서 89.5%, 그리고 200 µg/ml에서 91.2%로 점차 높아지는 경향을 나타내고 있다(Fig. 9). 최근 연구에서는 백작약(*Paeonia japonica*)의 열수 추출물로부터 지질과산화 억제능을 측정할 결과 50 µg/ml 농도에서 62%로 나타난 것으로 보아 산화적 스트레스를 감소시킬 것이라고 한 바 있다(Jeong *et al.*, 2003). 본 연구에서도 팔 열수 추출물은 지질과산화 억제율이 200 µg/ml에서 91.2%로 확인되어 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 감소시키는 데 높은 효과로 작용할 것으로 생각된다.

세포의 비정상적 증식을 저해하는 것으로 알려져 있는 p21 단백질은 세포주기 상 G1 기에서 암세포의 증식을 억제하는 가장 중요한 세포 주기조절 인자 중 하나이다(Morgan, 1995). 따라서 팔 열수 추출물의 산화적 세포 손상에 대한 억제 활성을 조사하기 위해 p21 단백질 발현율을 분석하였다. 본 연구에서 무처리 대조군에 비해 Fe<sup>2+</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 라디칼 처리군의 p21 단백질 발현율은 36.8%를 나타냈으나 팔 열수 추출물과 라디칼을 함께 처리하였을 때에는 처리농도가 높아짐에 따라 발현율도 점차 증가하여 1.6 µg/ml에서 42.6%, 8 µg/ml에서 50.6%, 40 µg/ml에서 약

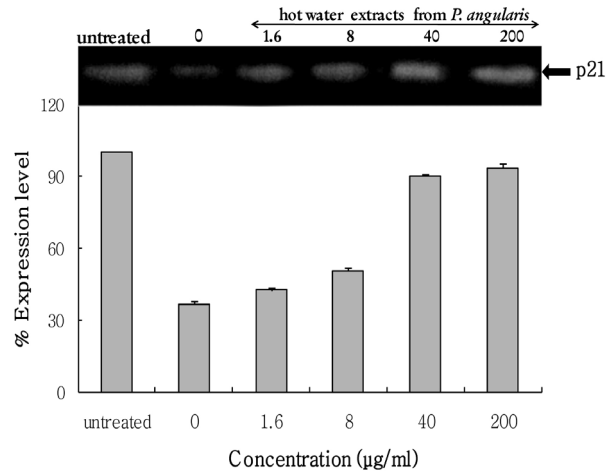


Fig. 10. Expression of p21 protein induced by hydroxyl radical. In the plot, % expression level were calculated by being compared with the density of the control band (untreated) using UN-SCAN-IT program. Lane 1 is untreated and lane 2 is treated with FeSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> without extracts. Lane 3-6 were treated with varying concentrations of the extracts (1.6, 8, 40 and 200 µg/ml).

90.3%, 200 µg/ml에서 93.6%로 확인되어 매우 높은 활성을 나타내었다(Fig. 10). 동충하초(*Cordyceps militaris*) 열수 추출물의 경우 인체 간암세포주인 HepG2 세포의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 처리농도가 높아짐에 따라 p21의 발현 증가가 관찰되어 HepG2 세포의 증식 억제에 연관성을 지닐 수 있다고 보고된 바 있는데(Kim *et al.*, 2008), 본 연구 결과 팔 열수 추출물의 p21 단백질 발현율은 200 µg/ml에서 93.6%로 확인되어 산화적 세포 손상에 대한 억제효과가 높을 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구에서는 열수 팔 추출물이 hydroxyl 라디칼에 의해 유도되는 산화적 스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위하여 항산화활성과 DNA 및 세포의 산화적 손상 억제 효과를 조사하였다. 팔 열수 추출물의 DPPH 라디칼과 hydroxyl 라디칼의 제거능은 다소 낮았으나, Fe<sup>2+</sup>-chelating과 과산화수소 제거효과는 높게 나타나 활성산소의 생성을 억제하는 데 효과적인 것으로 확인되었다. 또한 팔 열수 추출물의 *in vitro* DNA cleavage, DNA migration 및 H2AX의 인산화비 억제활성은 높은 활성을 보여주고 있어 라디칼에

의한 DNA 손상 억제에 효과적으로 작용하였다. 또한 지질 과산화와 p21의 발현율을 통해 세포의 산화적 손상에 미치는 영향을 살펴보면 지질과산화 억제능과 p21의 발현율에 매우 효과적으로 작용하고 있어 라디칼에 의한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 것으로 생각된다.

## 인용문헌

- Abu-Ghannam, N. 1998. Modelling textural changes during the hydration process of red beans. *J. Food Eng.* 38: 341-352.
- Balavoine, G.G. and Y.V. Genletii. 1999. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants, Part I: convenient assay. *Nitric Oxide.* 3:40-54.
- Cho, E.S., K.W. Lee and H.J. Lee. 2008. Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrogen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK. *Mutat. Res.* 640:123-130.
- Choi, S.I., Y.M. Lee and T.R. Heo. 2003. Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng* 18:282-288 (in Korean).
- Gutteridge, J.M.C. and B. Halliwell. 1994. Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 1-62.
- Hatano, T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effect on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Nat. Med.* 49:357-363.
- Hsu, B., I. Coupar and K. Ng. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem.* 98:317-328.
- Jeong, I.Y., J.S. Lee, H. Oh, U.H. Jeong, H.R. Park and S.K. Jo. 2003. Inhibitory effect of hot-water extracts of *Paeonia japonica* on oxidative stress and identification of its active components. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 739-744 (in Korean).
- Jeong, J.B., B.O. De Lumen and H.J. Jeong. 2010. Lunasin peptide purified from *Solanum nigrum* L. protects DNA from oxidative damage by suppressing the generation of hydroxyl radical via blocking fenton reaction. *Cancer Letters* 293:58-64.
- Jeong, J.B., J.H. Park, H.K. Lee, S.Y. Ju, S.C. Hong, J.R. Lee, G.Y. Chung, J.H. Lim and H.J. Jeong. 2009. Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect. *Food Chem. Toxicol.* 47:525-529.
- Ji, L.L. 1993. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sport Exercise.* 25:225-231.
- Kang, K.A., R. Zhang, M.J. Piao, D.O. Ko, Z.H. Wang, B.J. Kim, J.W. Park, H.S. Kim, D.H. Kim and J.W. Hyun. 2008. Protective effect of irisolidone, a metabolite of kakkalide, against hydrogen peroxide induced cell damage via antioxidant effect. *Bioorg. Med. Chem.* 16:1133-1141.
- Kim, H.J., K.H. Sohn and H.K. Park. 1990. Emulsion properties of small red bean protein isolates. *Kor. J. Soc. Food Sci.* 6:9-14 (in Korean).
- Kim, J.W., B.S. Moon, Y.M. Park, N.H. Yoo, I.J. Ryoo, T.C. Nguyen, I.D. Yoo and J.P. Kim. 2005. Structures and antioxidant activity of diketopiperazines isolated from the mushroom *Sarcodon aspratus*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 48:93-97 (in Korean).
- Kim, K.M., C. Park, Y.H. Choi and W.H. Lee. 2008. Induction of apoptosis by water extract of *Cordyceps militaris* (WECM) in human hepatocellular carcinoma HepG2 Cells. *J. Life Sci.* 18:804-813 (in Korean).
- Kim, M.J., J.S. Choi, E.J. Song, S.Y. Lee, K.B.W.R. Kim, S.J. Lee, S.J. Kim, S.Y. Yoon, Y.J. Jeon and D.H. Ahn. 2009. Effects of heat and pH treatments on antioxidant properties of *Ishige okamurai* extract. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 41:50-56.
- Koh, K.J., D.B. Shin and Y.C. Lee. 1997. Physicochemical properties of aqueous extracts in small red bean, mung bean and black soybean. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29:854-859 (in Korean).
- Lee, H.K., I.G. Hwang, H.Y. Kim, K.S. Woo, S.H. Lee, S.H. Woo, J.S. Lee and H.S. Jeong. 2010. Physicochemical characteristic and antioxidant activities of cereals and legumes in Korea. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39:1399-1404 (in Korean).



- Lightfoot, T., C.F. Skibola, A.G. Smith, M.S. Forrest, P.J. Adamson, G.J. Morgan, P.M. Bracci, E. Roman, M.T. Smith and E.Z. Holly. 2006. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* 91:1222-1227.
- Looi, M.L., A.Z. Mohd Dali, S.A. Md Ali, W.Z. Wan Ngah and Y.A. Mohd Yusof. 2008. Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. *Eur. J. Cancer Prev.* 17:555-560.
- Masaki, H., S. Sakaki, T. Atsumi and H. Sakurai. 1995. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18:162-166.
- McKee, T. and J.R. McKee. 2002. *Biochemistry: the molecular basis of life.* McGraw-Hill, New York, USA.
- Meng, G.T. and C.Y. Ma. 2001. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. *Food Chem.* 73:453-460.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature.* 374:131-134.
- Oh, H.S., J.H. Kim and M.H. Lee. 2003. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of red bean and mung bean. *Kor. J. Soc. Food Cookery Sci.* 19:263-270 (in Korean).
- Park, M.H., S.M. Kang, H.Y. Jung and S.G. Hong. 2003. Protecting effects of vitamin E against immobilization stress-induced oxidative damage in rat brain. *Kor. J. Nutr.* 36:570-576 (in Korean).
- Pick, E. and Y. Keisari. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38:161-170.
- Raju, J. and R. Mehta. 2009. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr. Cancer.* 61:27-35.
- Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova and W.M. Bonner. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273:5858-5868.
- Seog, H.M., M.S. Seo, H.M. Kim, M.S. Ahn and Y.T. Lee. 2002. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34:889-892 (in Korean).
- Sirtori, C., C. Galli, J. Anderson, E. Sirtori and A. Arnoldi. 2009. Functional foods for dyslipidaemia and cardiovascular risk prevention. *Nut. Res. Rev.* 22:244-261.
- Smirnoff, N. and Q.J. Cumbes. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28:1057-1060.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44-84.
- Vuillaume, M. 1987. Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat. Res.* 186:43-72.
- Wickens, A.P. 2001. Ageing and the free radical theory. *Respir. Physiol.* 128:379-391.
- Yoshida, K., Y. Sato, R. Okuno, K. Kameda, M. Isobe and T. Kondo. 1996. Structural analysis and measurement of anthocyanins from colored seed coats of *Vigna*, *Phaseolus*, and *Glycine* legumes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:589-593.

(접수일 2010.10.28; 수락일 2010.12.22)