항산화 활성 평가

Evaluation of Antioxidant Activity

김 상 겸
Sang Kyum Kim

충남대학교 약학대학
College of Pharmacy, Chungnam National University

1. 산화적 스트레스와 항산화활성

(1) 산화적 스트레스

산화적 대사 (Aerobic metabolism) 과정은 세포가 에너지를 공급하기 위한 필수조건이며 호흡 부산물로서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 등은 산화적 손상을 유발할 수 있다. ROS와 같은 산화성물질은 정상적인 대사과정에서 생성되나 정상적인 상태에서 ROS 생성속도는 생체조직이 보유한 ROS 제거속도에 미치지 못한다. 따라서 산소를 소비하는 모든 생체는 친산화성물질(prooxidant)과 항산화물질(antioxidant)의 활성의 균형이 유지되는 것이 필수적이다. 만일 세포내에서 그 균형이 무너져 prooxidant가 우세하여 산화적 손상이 발생할 가능성이 높아진 상태를 '산화적 스트레스(oxidative stress)' 라고 정의한다. 세포내 모든 구성분이 산화성물질에 의한 공격대상이 되며 이것들은 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물을 포함한다. 따라서 산화적 손상에 의해 유발되는 인체질병은 대단히 다양하다.

(2) 활성산소종의 생성

산화성물질은 생체 내에서 산소가 소비되는 과정에서 발생한다. 포유동물이 흡입하는 산소의 90%는 미토콘드리아에 전달되어 호흡사슬(respiratory chain) 내에서 4개의 전자에 의해 환원되어 물을 생성하며 이 과정에서 ATP가 합성된다. 그러나 미토콘드리아에 도달한 산소의 약 5%는 불완전하게 환원되어 superoxide anion radical($O2 \cdot^-$), 과산화수소(H_2O^2), singlet oxygen, hydroxyl radical($\cdot OH$)과 같은 ROS를 만들게 된다. 정상적인 상태의 랫트간에서 하루에 $3x10^7$ 개의 $O_2 \cdot^-$가 만들어 진다. 포유동물의 체내에서 만들어지는 전체 자유기(free radical) 의 85% 이상은 이 과정에서 발생한다. 이 이외에도 ROS는 NADPH oxidase에 의해 매개되는 대사반응이나 외인성물질의 cytochrome P-450 의존성 대사반응, 식균작용

Corresponding author : Sang Kyum Kim.
Department of Molecular Toxicology College of Pharmacy, Chungnam National University 220 Gung-Dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
Tel: +82-42-821-5930
Fax: +82-42-823-6566
E-mail : sangkim@cnu.ac.kr

(phagocytosis), xanthine oxidase 등의 효소반응에서도 생성되며, 오존, 자외선, 방사선, 흡연에 의해서도 발생된다. 비산소활성종(non-oxygen reactive species)으로 산화질소(NO)와 여러 가지 퀴논성 물질이 있으며 산화질소는 $O_2 \cdot^-$과 반응하여 훨씬 반응성이 높은 peroxynitrite($ONOO \cdot^-$)를 생성하게 된다.

$O_2 \cdot^-$ 생성은 생물체내에서 여러 종류의 ROS 발생의 첫 단계이며 proton이 부가되어 더 반응성이 높은 perhydroxyl radical($HO_2 \cdot$)이 생성되던가 dismutation되어 H_2O_2를 생성한다. H_2O_2는 자체적으로 강력한 산화작용은 없으나 전이금속 (transition metal) 존재시 Haber-Weiss나 Fenton 반응을 통해 훨씬 반응성이 높은 $\cdot OH$를 생성한다.

(3) 생체의 항산화활성

생체는 ROS의 생성을 억제하든가 또는 산화성 물질의 공격을 방어하고 손상을 치유시킬 수 있는 매우 유효한 항산화 체계를 갖추고 있다. 따라서 정상적인 상태에서는, 즉 과도하게 ROS가 생성되지 않는 한, 산화적 스트레스는 발생하지 않으며 생체의 항상성(homeostasis)은 유지될 수 있다. 생체의 항산화 활성은 저분자의 항산화 물질과 항산화 효소로 나눌 수 있다. 항산화 효소로는 superoxide dismutase (SOD), catalase, GSH peroxidase가 대표적이며 저분자의 항산화 물질로는 glutathione(GSH), 비타민 E, 비타민 C, 베타카로틴 등이 포함된다.

2. 산화적 손상과 인체 질환

ROS는 불안정한 상태에 있으므로 세포내에서 지질, 단백질, 핵산 탄수화물 등과 반응하게 된다. 지질과산화(lipid peroxidation)는 산화성 물질의 공격에 의해 일차적으로 나타나는 현상이다. 지질과산화는 생체막의 불포화지방산과 산화성물질이 반응하여 일어난다. 이 반응에 의해 생체막의 물리화학적 성질이 변성되고 결국 세포의 유동성과 투과성을 변화시켜 세포내 소기관들의 팽창과 생체막 파괴를 가져온다. 또한 단백질의 산화과정은 노화, 백내장 발생, 방사선조사에 의한 세포손상에 중요한 역할을 한다. 이 증상들은 산화적 손상에 의한 카보닐 단백질의 축적이 증가하여 일어나는 것으로 보인다. 일반적으로 단백질의 산화는 단백질 상의 -SH기가 일차적으로 공격을 받아 일어난다. 유황함유단백질은 세포 내에서 수송체, 호흡, 각종 효소와 세포골격의 구성성분 등의 중요한 역할을 수행하므로, 단백질의 산화는 결국 세포의 기능과 생존을 위협하게 된다. 핵산의 산화는 DNA 돌연변이 및 발암과 관련이 있으며, 이것은 미토콘드리아 DNA와 RNA의 산화적 손상이 repair systems을 저해하기 때문이다. LDL의 산화적 변형은 동맥혈관을 변성시키고, 혈소판의 활성화를 유발하여 궁극적으로 동맥경화증의 원인이 된다.

ROS의 여러 가지 질환에서의 역할은 많은 연구자들의 관심분야이며 동시에 논란의 대상이 되고 있다. 실제적으로 산화성 물질이 세포의 항산화활성을 초과할 시에, 즉 산화적 스트레스의 유발은 발암, 심혈관 질환, 허혈-재관류 손상, 류마치스성 관절염, 염증, 노화, 알레르기, 퇴행성 신경계 질환, 파킨슨씨병 등의 여러 가지 질환 발생과 유관한 것으로 보고 되었다.

ROS는 염증 세포에서 이물질에 대한 방어체계로서 생성되며 생성된 ROS는 직접적으로 주위 조직에 손상을 유발시키거나 염증반응을 매개한다. 실제로 체내 항산화 활성을 증가시키는 항산화물질이나 superoxide dismutase(SOD), catalase와 같은 항산화효소는 항염증작용을 갖는다. SOD의 약제학적 제형인 Orgotein의 경우 다양한 염증성 및 퇴행성 질환 치료에 효과가 있다.

오랫동안 연구자들은 당뇨나 당뇨와 관련된 합병증과 산화적 스트레스와의 관련성에 대해 조사해 왔다. 앞서 지적한 바와 같이 산화적 스트레스는 DNA, 지질, 단백질에 손상을 유발할 뿐 아니라 세포 항상성의 파괴, 손상된 분자의 축적 등을 일으킨다. 당뇨병에서 높은 빈도로 나타나는 동맥경화증은 산화적 스트레스에 의한 단백질의 산화와 지질과산화와 관련되어 있다. 눈의 망막에는 다가불포화지방산이 풍부하여 저산소상태에 반복 노출되면 지질과산화가 증가한다. 이것이 단백질의 구조를 파괴하고 -SH기의 고갈과 카르보닐유도체의 축적 등을 유발하여 단백질의 산화-환원상태 (redox status)를 변화시켜 백내장을 일으킨다. 노인성 백내장 역시

산화-환원상태의 불균형에 의해 발생한다. 최근에는 혈당 조절이 원활하지 않은 경우 ROS 및 nitrogen species의 과잉생성과 항산화 활성의 감소, 효소반응의 이상에 의해 각종 심혈관계 질환이 발생한다고 보고되었다.

산화적 스트레스는 직접적이거나 또는 기관지 염증에 관련된 분자 조절기전을 통해 호흡기 질환에도 관여한다. 만성기관지장해(COPD ; chronic obstructed pulmonary disease) 환자와 흡연자의 호흡, 혈액, 소변에서도 산화적 스트레스의 증거가 검출된다. 산화적 스트레스에 의해 염증매개물질의 유전자 발현이 증가하며 세포내 항산화물질의 감소나 결핍이 일어난다. COPD 환자의 경우 호흡장해로 인해 항산화물질의 결핍이 쉽게 일어나고 따라서 항산화물질을 식이의 형태로 공급할 경우 치료에 도움이 된다.

자유기에 의한 산화적 손상은 허혈-재관류 손상과도 관련이 있다. 허혈로 인한 무산소 상태에서 세포의 pH가 저하되며 이 상태가 오래 지속될수록 재관류과정에서 비가역적인 손상은 증가한다. 재관류단계에서 내피세포로부터 NO가 분비되며 염증세포를 활성화시킨다. 그 결과 cytokines 등이 유리되며 이들 물질은 염증부위를 확대하여 세포손상을 직접적으로 유발한다. 한가지 예로서 간이식을 들 수 있다. 간이식 과정에서 발생하는 간조직의 허혈 상태이후 재관류 초기 단계에서 Kupffer cells이 활성화되며 이 과정에서 ROS가 발생한다. 그 결과 GSH이 감소하며 수 시간 후에는 neutrophil이 간 조직을 공격하게 된다.

에탄올에 의해 나타나는 독성이 자유기 생성 및 산화적 손상과 관련되어 있다는 것은 잘 알려져 있다. 에탄올은 간에서 주로 대사되며 대사체인 아세트알데히드가 protein adduct를 형성한다. 대사과정에서 에칠라디칼과 같은 자유기가 생성되어 간의 산화적 손상과 GSH 고갈은 심화된다. 에탄올에 의한 이와 같은 대사장해 및 항산화활성 감소에 의해 지질과산화가 촉진되어 간세포 내 지방침윤이 일어난다. 또한 랫트에게 급성이나 만성적으로 에탄올을 투여할 경우 단백질과 DNA 산화가 증가한다고 보고되었다. 단백질 산화는 Fenton reaction을 통해 일어나며 DNA 산화는 돌연변이와 암의 발생을 증가시킨다. 지질과산화로 인해 생성된 부산물은 Kupffer cell과 Ito cell을 활성화시켜 만성적인 음주로 인한 간섬유화 발생을 촉진시킨다.

지방간은 중성지방이 세포 내에 축적되는 현상으로 대사장해, 갑상선기능항진증, 그리고 알콜, 약물, 바이러스감염 등에 의해 발생한다. 동물실험에서 산화성물질은 간의 지방축적이 나타나지 않은 상태에서도 불포화지방의 과산화를 증가시킨다. 또 지방간에 항산화제(비타민 E, C, GSH)를 소량 투여했을 때 자유기의 공격으로부터 세포가 보호되는 것이 보고되었다. 지방침윤간세포에서 분리한 미토콘드리아는 에너지 생산이 불가능하고, 항산화물질의 결핍, 단백질 산화, 팽창과 같은 구조적 변화가 관찰되었으며, 이런 증상은 절식시킨 동물에서 더욱 현저하다. 절식시킨 랫트의 지방간은 허혈-재관류에 의한 손상이 정상 랫트에 비해 증가하고 ATP 의 생성은 감소한다.

통풍은 퓨린 대사의 최종 산물인 뇨산이 체외로 배출되거나 정상적으로 처리되지 못하고 체내에서 결정을 형성하여 생기는 질환으로 산화적 반응이 관여한다. 식세포에 의해 포획된 뇨산은 과립구에 의해 생성되는 과산화물과 함께 Fenton 반응을 일으킬 수 있다. 이 결과 뇨산결정을 포획한 과립구가 용해되며 이것이 통풍의 첫 번째 병리현상이 된다.

산화적 손상은 전신성홍반성반창(SLE; systemic lupus erythematosus)의 병태생리와도 관련되어 있다. SLE 환자의 혈장 중 지질과산화물은 증가하며 NO, SOD와 GSH-Px 활성은 감소한다. 이러한 결과는 산화적 스트레스, NO, 항산화활성이 SLE의 발생에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

노화 과정의 해석에 있어서도 자유기가 관련된 이론이 제기되었으며 이것은 연령증가에 따라 미토콘드리아 DNA의 돌연변이가 증가하고 세포사멸이 촉진된다는 가설에 기초한다. 또한 동물의 연령증가에 따라 자연발생적인 산화적 손상은 증가한다.

3. 항산화 관련 효능평가 방법

(1) 항산화 효소측정과 그 의미

항산화 효소의 활성이나 단백질 발현 등을 평가하는 방법은

많은 연구에서 사용되고 있다. 그러나 이들 항산화 효소의 발현이 산화적 손상에 의해 유도된다는 점을 고려할 때 이들 항산화 효소의 발현이나 활성 증가가가 체내 항산화 활성의 증가와 일치하지 않을 수 있다. 즉, 생명체가 반복적으로 산화성물질에 노출될 경우 세포는 이에 적응하기 위해 자체의 항산화 기전을 증가시켜 산화적 손상에서 자신을 보호하게 된다. 대표적인 항산화효소인 SOD, GSH-Px의 활성측정은 그 자체의 의미는 갖고 있으나 생체조직 중 이 효소의 활성이 증가한 것이 곧 생체가 산화성물질에 대한 항산화활성이 증가한 것은 아니다. 생체는 대단히 복잡한 기전에 의해 조율되고 있으며 특히 항산화활성과 같이 여러 가지의 효소와 항산화물질이 협력적으로 작용하여 산화성물질의 공격에 대응하고 있을 때, 한 지표의 변화가 곧 생체조직의 항산화활성의 변화를 의미하지는 않는다. 실제로는 생체에 산화적 스트레스가 부과될 때 SOD, GSH-Px, catalase와 같은 효소의 활성은 증가한다. 그러나 이 효소활성이 감소한 경우를 생체내 산화적 스트레스의 저하에 의한 결과로 해석하는 것은 합리적이지 못하다.

이와 같은 문제는 관련분야 연구자들이 공통적으로 인식하고 있으며 유럽 6개국에 의해 기능성식품과학의 기본개념을 과학적으로 연구하고 정리하기 위해 결성된 European Commission Concerned Action on Functional Food Science in Europe(FUFOSE)도 1999년에 발표한 논문 "Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Concept"에서 ROS에 대한 방어기능평가를 위해 인체 내에서 발생하는 산화성 물질의 생성을 측정하는 것이 불가능함을 지적하고 새롭고 유효한 생체지표 제시의 필요성을 인정하고 있다. 또 여기에서는 산화적 손상을 측정하는 기존의 방법들의 유효성확보를 위해 개선되어야 할 필요성을 제시하고 이를 위해서 다양한 방법들에 의한 측정결과를 비교검토하는 작업을 제안하였다 (Prior et al., 2005; Huang et al., 2005).

(2) 항산화물질의 측정

체내에는 다양한 항산화물질이 존재한다. 즉, GSH, 비타민 C와 E, 베타카로틴, 뇨산, 타우린, 여러 가지 아미노산, 빌리루빈 등이 항산화활성을 보유하고 있다. 따라서 이들 물질의 함량변화 측정은 조직의 항산화활성측정의 한 가지 지표로서의 의미를 갖는다. 특히, 항산화 기능성을 주장하는 식품이 이들 항산화물질을 함유하고 있는 경우에 이 물질의 함량은 반드시 정량하여야 한다.

생체내 항산화물질 중에서 조직내 함량이나 작용의 다양성을 고려할 때 가장 큰 의미를 갖는 것은 GSH이다. 따라서 항산화성을 주장하는 기능성식품이라면 성분에 관계없이 GSH 관련지표는 조직내 항산화활성을 측정하기 위한 지표로 활용되어야 한다. 여기에는 조직이나 체액의 GSH 함량 이외에 산화적 손상의 지표로 사용되는 GSH/GSSG 비율, GSH 생체합성에 관여하는 주요 효소인 gamma-glutamylcysteine ligase활성과 전구물질인 cysteine 농도 등이 포함될 수 있다.

(3) 지질과산화 측정

조직 구성물의 산화적 손상의 측정은 매우 유효한 산화적 스트레스의 지표가 될 수 있다. 특히 지질의 과산화 측정은 이 목적으로 사용되는 대표적인 지표이다. 지질과산화 과정의 initiation 단계에서 생성되는 diene conjugates의 측정, 지질과산화 반응의 부산물로 생성되는 hydrocarbon gas 측정, 또 TBA(thiobarbituric acid)를 이용한 측정이 지질과산화를 측정하기 위해서 사용될 수 있는 지표들이다. 이중 가장 보편적인 방법은 TBA법으로서 이것은 각종 생체막의 과산화반응 결과 생성되는 malondialdehyde(MDA)를 TBA와 반응시켜 생성물을 발색시키고 532nm에서 정량하는 것이다. 이 방법은 MDA 이외에도 다른 물질에 의한 간섭이 매우 높으며 이 문제를 해결하기 위해서 최근에 형광검출기를 장착한 HPLC를 사용하여 TBA-MDA adduct를 정량하는 방법이 제시되어 있다. 그러나 이상의 방법들 중에 어느 한가지만이 지질과산화 측정법으로 유효한 것은 아니며 또한 결과를 해석할 때 지질의 과산화 생성물이 검출되지 않았다고 해서 조직 내에서 과산화 반응이 전혀 일어나지 않았다는 증거는 될 수 없다.

(4) TOSC(Total Oxyradical Scavenging Capacity)의 측정

생명체가 반복적으로 산화적 스트레스에 노출될 경우 세포는 이에 대응하기 위해 항산화 활성을 갖는 효소나 물질의 생성을 증가시켜 생체를 보호하게 된다. 따라서 개별적인 항산화물질이나 관련 효소활성의 측정만으로는 조직이나 장기의 항산화 능력을 정확하게 평가할 수 없다. 최근에 들어와 조직의 총체적인 항산화활성을 측정하기 위한 다양한 시도가 진행되고 있다. 생체조직 내의 총항산화활성측정은 활성산소종에 의한 독성에 대한 저항성을 판단하는데 유효하며 이 목적을 위해 몇 가지 방법이 개발된 바 있다. 1980년대 중반에 자유기 생성물질과 항산화물질을 함유한 실험계에서 최대산소소비에 요하는 시간을 측정하여 그 결과를 수용성 비타민 E 유도체인 Trolox로 측정된 시간과 비교하는 total radicaltrapping antioxidant parameter(TRAP)법이 개발되었다. 그 후 ROO · 이나 · OH이 phycoerythrin(PE)에 주는 화학적 손상을 PE가 산화되며 방출하는 형광의 감소로 측정하는 방법이 제시되었으며 이 방법을 활용하여 몇가지의 항산화활성 측정법이 제안되었다. ROO · 에 의한 PE 형광감소속도는 일정하지만 항산화물질이 존재 시에는 일시적인 지연이 관찰된 후 형광의 감소가 신속하게 일어난다. 따라서 시료와 대조군의 AUC의 차이를 측정하는 ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) 측정법과 항산화 물질이 존재할 때 PE의 보호시간, 즉 lag-phase를 측정하는 방법 등이 개발되었다. 한편 Regoli와 Winston은 ROS와 반응하여 에칠렌으로 산화되는 α-keto-γ-methiolbutyric acid(KMBA)를 사용하여 생체 조직의 항산화 활성을 측정하는 방법을 개발하였다. 에칠렌은 밀폐된 반응용기 내에서 공기 시료를 취해 가스크로마토그래피로 정량할 수 있다. 이 방법의 장점은 활용성에 있는데 KMBA는 다양한 산화성 물질 (· OH, ROO · , HOCl, ONOO · $^-$ 등)과 반응하여 에칠렌을 생성하므로 항산화활성이 높은 조직이나 혈액 시료에서는 에칠렌의 발생이 저하된다. 이 방법에서는 KMBA와 ROO · , · OH 또는 ONOO · $^-$와의 반응에 의해 발생하는 에칠렌의 농도를 반응시간의 변화에 따라 측정하여 area under the curve(AUC)를 구하고 대조군과 투여군에서의 AUC의 비율로부터 TOSC를 산출한다. ROO · 는 2,2'-azobisamidinopropane을 가열하여 발생시키며, · OH는 철과 비타민 C를 이용한 Fenton reaction으로, ONOO · $^-$는 SIN-1의 자발적인 붕괴를 통해 발생시킨다. 시료로부터 측정된 TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 이 측정값은 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

실제로 당알코올인 erythritol, xylitol, sorbitol과 mannitol의 항산화 활성을 비교한 연구에서 hydroxyl radical, peroxyl radical 및 peroxynitrite에 대한 포획능은 hydroxyl group의 수에 의존적인 것으로 관찰되었다 (Kang et al., 2007). 이 결과는 TOSC 방법이 정량적으로 oxy-radical에 대한 포획능을 평가할 수 있음을 시사한다.

참고 문헌

1. 김영철 (2003). 콜레스테롤조절 관련 기능성 평가체계 구축, 식품의약품안전청.
2. Kang KW, Kwak SH, Yun SY and Kim SK. Evaluation of antioxidant activity of sugar alcohols using TOSC assay. J Toxicol Pub Health 2007;23(2):143-150
3. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem. 2005;53(6):1841-56.
4. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53(10):4290-302.