J. Fd Hyg. Safety 17(2), 106–116 (2002)

양강추출물의 활성산소종 유도 세포독성과 DNA 손상에 대한 방어효과

이승철 · 신경승* · 허문영†
강원대학교 약학대학, 경인지방 식품의약품 안전청

Protection of ROS-induced cytotoxicity and DNA damage by the extract of *Alpinia officinarum*

Seung Cheol Lee, Kyoung Seung Shin*, Moon Young Heo†
College of Pharmacy, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
**Kyung-In FDA, Inchon 400-103, Korea*

Abstract The 70% ethanol extract of *Alpinia officinarum* and its major flavonoid, galangin showed strong antioxidative effect on the lipid peroxidation of ethyl linolate with Fenton's reagent and free radical scavenging effect to DPPH radical generation. However, they did not reveal any pro-oxidant effect on bleomycin-Fe(III) dependent DNA degradation. They also showed the protective effect against H_2O_2, KO_2 or UV-induced cytotoxicity in mammalian cells. They also showed the suppressive effect of DNA damage induced by H_2O_2 or KO_2 with dose-dependent manner in single cell gel electrophoresis(SCGE) assay. On the other hand, they have an anticlastogenic effect against adriamycin-induced micronucleated reticulocyte in peripheral blood of mice. These results suggest that the mechanism of inhibition by 70% ethanol extract of *Alpinia officinarum* and galangin against reactive oxygen species (ROS)-induced genotoxicity or cytotoxicity is due, at least partly, to their antioxidative and free radical scavenging properties without pro-oxidant effect. All these results indicate that 70% ethanol extract of *Alpinia officinarum* and galangin may be useful for protection against ROS-induced cytotoxicity and DNA damage.

Key words □ *Alpinia officinarum*, galangin, reactive oxygen species, antioxidative effect, free radical scavenging effect, DNA damage, chemoprevention

최근 oxidative stress에 의한 돌연변이, 염색체 손상으로 비롯된 암과 노화억제제를 천연물로부터 찾아내는 일에 매우 관심이 커지고 있다.[1-4] 양강(良姜)은 생강과(Zingiberaceae) 식물인 *Alpinia officinarum*의 근경으로서 옛부터 방향성 건위, 진통, 진토약으로서 소화불량, 구토, 복통, 하리에 응용하고 있는 생약이다. 주요성분은 정유가 0.5-1%로서 1,8-cineol, methyl cinnamate, α-cadinene등과 신미성분으로서 galangol, flavonoid성분으로서 galangin, kaempfride, alpinin 등을 함유하고 있다.[5]

본 연구에서는 양강추출물과 함유 주성분인 galangin을 대상으로 하여 지질과산화억제효과와 free radical 소거작용, pro-oxidant effect를 비교 연구하고, 이들의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)들에 대한 효과를 규명하기 위해서 hydroxyl radical(·OH) 생성물질로서 H_2O_2와 superoxide($O_2^{\cdot-}$) 생성물질로서 KO_2 유도 및 UV-B, C유도 세포독성에 대한 억제효과를 연구하였다. 한편, H_2O_2유도 DNA에 대한 산화적 손상억제효과를 single cell gel electrophorsis(SCGE)를 실시하여 평가하였다. 또한, superoxide anion 유도제로서 adriamycin에 대한 마우스 소핵시험을 실시하여 염색체 손상에 대한 억제효과를 규명하였다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

양강추출물의 제조

서울의 경동시장에서 구입한 양강(*Alpinia officinarum*)의 근경 50 g을 각각 물, 30% 에틸알콜, 50% 에틸알콜, 70% 에틸알콜, 100% 에틸알콜, 80% 메틸알콜, 100% 메틸알콜, 아세톤, n-부틸알콜, 클로로포름, 에틸아세테이트, 에테르, 헥산, 이소프로필알콜, n-프로필알콜 300 ml를 가하여 7일간 실온에서 추출하고 진공농축하여 각각의 양강추출물를 얻었다.

양강추출물 중 galangin의 분리정량

각각의 양강추출물을 1 mg/ml의 농도(이때 용매는 추출용매를 사용하였음)로 만들었으며 galangin(3,5,7-trihydroxy

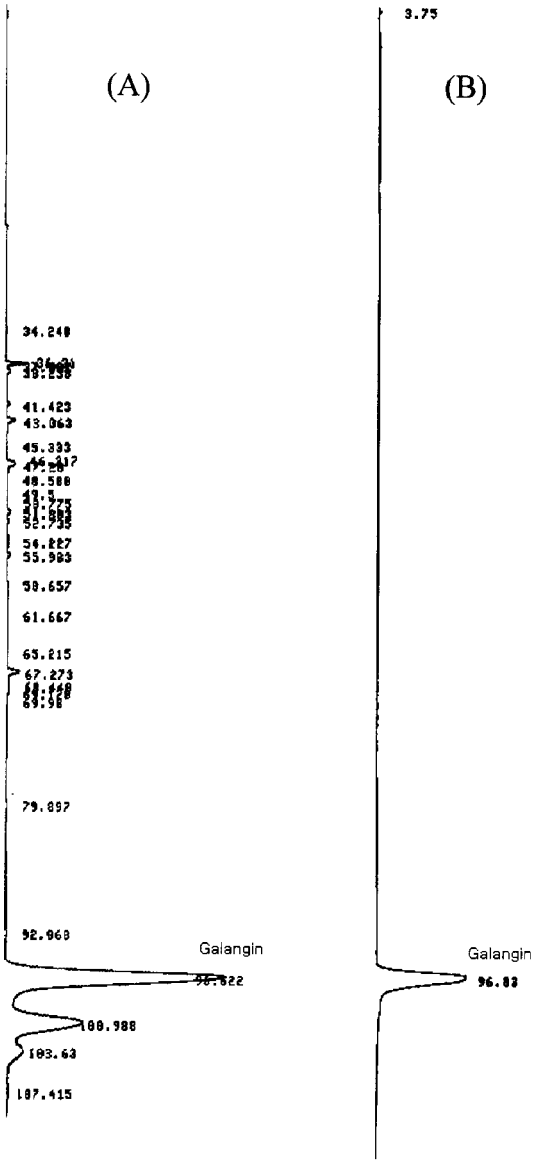

Fig. 1. HPLC chromatogram of 70% ethanol extract of *Alpinia officinarum*(A) and galangin(B)

flavonol)은 aldrich사에서 구입한 것을 재결정등으로 정제하여 표준품으로 사용하였다. HPLC의 분석조건은 Shimadzu제 UV 검출기 360 nm, 컬럼 ODS(Shimadzu), 이동상 A : 99% acetonitrile, B : water : acetonitrile(0-15 min : B 9%, 15-150 min : B 40%), 유량 1 ml/min으로 하였다. Fig. 1에 HPLC chromatogram을 나타내었다.

실험동물

본 실험에서 사용한 C57BL mice는 (주) 대한실험동물에서 공급받아 강원대 약대 동물사육실내에 있는 양압의 무균 동물챔버에서 23 ± 1°C 및 상대습도 55 ± 7%의 조건으로 7-10일 적응시킨 후 사용했다. 사료는 삼양유지의 마우스식 pellet사료를 주며, 물은 자유롭게 먹게 하고, 12h/12h(L/D) cycle의 조건에서 실험하였다.

세포배양방법

Chinese hamster lung(CHL) cell과 NIH/3T3 cell을 사용하여 수시로 계대하여 실험목적에 맞게 배양하였다. 세포배양은 10% FBS(GIBCO), 1% glutamine(GIBCO), 1% penicillin-streptomycin(GIBCO) 함유하는 MEM, DMEM (GIBCO) 배지를 각각 CHL 및 NIH/3T3 세포배양용으로 사용하였다. 한편, primary cell culture를 위해서는 C57BL mouse spleen lymphocyte를 분리하여 실험하였다. C57BL 마우스로 부터 무균적으로 비장을 적출하여 일회용 50 ml 무균 실린지의 plunger를 이용하여 세포를 분리시킨 후 cell count하여 $20x10^6$ cell/ml로 만들었다. 이 세포현탁액 0.5 ml씩을 배지에 가하여 실험하였다. Complete medium은 15% heat inactivated fetal bovine serum(GIBCO No.200-6140), 1% sodium heparin(1,000 unit, Invenex No.33-1), 1% penicillin-streptomycin(GIBCO No.600-5145), 2% con-canavalin A(Con A, Sigma No. C-5275), 0.01% β-mercaptoethanol(0.05M, Sigma No. M-6250)이 되도록 RPMI 1640(GIBCO) culture medium으로 조제하여 사용하였다. 배양은 모두 37°C, 5% CO_2 배양기에서 이루어졌다.

프리라디칼소거작용

DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazil)는 분자내 radical을 함유하고 있는데 이것이 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만든다. DPPH(0.47 g/ml) 2 ml에 sample의 소정농도용액 2 ml 가하고 5분간 섞고 30분간 방치 후 520 nm에서 측정하였다.[6]

지질과산화억제효과

검체들의 지질과산화 억제효과를 측정하기 위하여 Fenton's reagent를 이용하여 관찰하였다. 증류수에 sodium dodecyl sulfate 2%를 가온하여 용해시키고 0.79 mmol potassum chloride, 0.25 mmol Trizma(pH 7.4), 1 μmol $FeCl_2$를 첨가하고 0.025 mM H_2O_2를 용해시켰다. 이 용액에 10 μl ethyl linoleate를 첨가한 후 미리 만들어 보관한 검체의 stock solution을 소정의 농도로 0.1 ml씩 분주하였다. 이 모든 양이 각 sample당 5 ml가 되도록 하였다. 만들어진 sample은 vortex mixer로 즉시 혼합하고 aluminum foil로 감싸서 16h 동안 55°C에서 incubation시킨다. 각각의 sample에 50 μl 4% BHT ethanol solution을 분주하여 산화를 정지시킨 다

음 항산화 정도를 TBA법으로 측정하였다.[7,8]

Pro-oxidant effect

Bleomycin-Fe(III) dependent DNA degradation에 미치는 양강추출물과 galangin을 비롯한 antioxidants의 pro-oxidant 효과를 100 μg/ml calf thymus DNA에 50 μg/ml bleomycin, 0.025 mM $FeCl_3$, 5 mM $MgCl_2$, 30 mM KH_2PO_4-KOH buffer(pH 7.0), 소정농도용액의 검액을 총 1 ml가 되도록 가해 1 hr 동안 37°C에서 incubation시킨 후 1% TBA에 반응시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.[9]

세포독성억제작용 (cytoprotective activity)

H_2O_2 또는 KO_2 유도 세포독성에 대한 억제효과

CHL cell과 마우스 spleen lymphocyte에 있어서의 H_2O_2 및 KO_2의 세포독성에 대한 검체들의 효과를 MTT법[10]에 따라 microplate reader로 측정하였다. 이때 CHL cell은 well 당 25,000개로 하고 배지 80 μl 중에서 24시간 배양 후 H_2O_2 또는 KO_2 10 μl 및 검체 10 μl를 가하고 CO_2 incubator에서 20시간 더 배양한 후 MTT시약 15 μl를 가하고 4시간 배양 후 DMSO를 200 μl를 가하고 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, mouse spleen lymphocyte는 well 당 750,000개로 배양하고 이하 동일하게 시험하였으며, 단 24시간 배양은 생략하였다.

UV 유도 세포독성에 대한 억제효과

NIH/3T3 cell에 있어서의 UV-B, C의 세포독성에 대한 검체들의 효과를 MTT법[10]에 따라 microplate reader로 측정하였다. 이때 사용한 UV 램프는 UV-B(Model XX-15B, medium wavelength: 312 nm, Spectroline, Westbury, NY, USA)와 UV-C (Model XX-15F, medium wavelength: 254 nm)를 사용하였으며 DRC-100X digital radiometer (Spectroline)를 사용하여 강도를 측정하였다. 세포를 배지 90 μl중에서 24시간 배양 후 검체를 10 μl 가하고 UV(1.0mW/cm2)를 10분간 쪼인 후, CO_2 incubator에서 20시간 더 배양한 후 MTT시약 16 μl를 가하고 4시간 배양 후 DMSO를 200 μl를 가하고 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DNA 손상억제효과

CHL cell을 배양하여 SCGE 시험을 실시하였다.[11] 양성대조 물질로는 H_2O_2와 KO_2를 사용하였다. 이때 검체를 양성대조물질과 동시처리하거나 단독투여하여 검체의 DNA손상 억제효과를 평가하였다. 실험은 CHL cell 5×10^4개를 culture dish(10 cm)에 심고, 24 h후에 양성대조물질인 H_2O_2와 K_2O을 10 μl와 DMSO 10 μl를 투여하였다. 24 h후 culture dish에 trypsin 2 ml를 넣어 cell을 harvest하여 test tube에 취하였다. 2,000 rpm으로 원심분리 후 PBS로 세척 후 다시 2,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 버리고 각각에 0.5%-LMPA(low melting point agarose)를 1 ml를 가해준 뒤 각각 1분씩 섞어준다. 0.65%-NMPA(normal melting point agarose) 130 μl를 미리 입힌 slide(fully frosted)에 이 액 75 μl를 떨어뜨린 후 cover slide를 덮는다. 냉장고에서 약 15분간 굳힌 뒤 cover slide를 제거하고 그 위에 다시 0.5%-LMPA를 100 μl를 떨어뜨린 후 cover slide로 덮고 냉장고에서 15분간 굳힌다. Cover slide를 제거한 후 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담가서 약 30분간 용해시킨다. 그 후 전기영동완충액(300 mM NaOH, 1 mM Na_2EDTA, pH 13)에 15분간 담가 정치하였다. 전기영동장치에 slide를 양극 쪽으로 배열한 뒤 25 V, 250 mA정도에서 15분간 전기영동한다. 슬라이드를 꺼내 0.4 M tris(pH7.5)에 15분간 담가 중화하였다. Tray에 걸어 말린 후 ethidium bromide(20 μg/ml)를 50 μl를 각각에 떨어뜨린 후 515-560 nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰하여 image analyzer인 COMET 3.1(Kinetic image, England)을 사용하여 슬라이드 당 25 cell을 분석했다.

소핵 시험

마우스 꼬리 정맥을 이용하여 소핵시험을 실시하였다.[12] 양성 대조물질로는 superoxide 생성물질로서 adriamycin을 사용하였다. 마우스에 galangin, 양강추출물을 용량별로 경구투여하고 동시에 양성대조물질로 adriamycin 5 mg/kg을 복강주사하여 oxidative DNA damage를 준 다음 48 hr후 마우스 꼬리 정맥을 주사바늘로 찔러 소량 분출해 나오는 혈액을 미리 acridine orange로 코팅된 슬라이드 상에 떨어뜨리고 곧 카바글래스를 덮고 적어도 2시간 이후에 소핵을 관찰하였다. 관찰은 형광현미경(blue excitation, 488 nm & yellow filter, 515 nm)에서 1000×로 하였다.

결 과

양강추출물중 galangin의 함량

Table 1에 나타낸 것처럼 양강의 여러 가지 용매추출물 중 galangin의 함량이 높은 것은 ethyl acetate와 acetone으로서 각각 16.84%의 함량을 나타내었다. 일반적으로 알콜농도가 높을수록 galangin의 함량은 높아졌다. 에틸알콜의 경우 30%에서 0.38%, 50%에서 2.18%, 70%에서 4.44%, 100%에서 9.66%였으며 메틸알콜의 경우는 80%에서 5.81%, 100%에서

Table 1. Inhibitory activity of lipid peroxidation and free radical scavenging activity by various solvent extracts of *Alpinia officinarum*

Extract	Galangin content(%)[1]	% Inhibition(at 25 μg/ml)[2]	
		Free radical	Lipid peroxidation
Water	Not Detected	11.0	21.5
30% ethyl alcohol	0.38	33.1	13.5
50% ethyl alcohol	2.18	37.5	25.8
70% ethyl alcohol	4.44	44.5	17.0
100% ethyl alcohol	9.66	54.7	32.2
80% methyl alcohol	5.81	45.4	69.8
100% methyl alcohol	8.27	52.9	61.3
acetone	16.84	30.4	50.0
n-butyl alcohol	13.09	26.9	68.4
chloroform	10.13	17.1	61.7
ethyl acetate	16.84	21.8	43.9
ether	15.39	21.5	56.6
hexane	0.83	0.8	59.8
isopropyl alcohol	14.50	17.4	22.0
n-propyl alcohol	14.77	20.2	53.5

[1,2] n=3

Table 2. Free radical scavenging effect of *Alpinia officinarum* extracts and galangin

Treatment (/ml or M)	OD_{520nm}	
	Mean S.D.	% Inhibition
Alpinia officinarum (70% EtOH)		
0 μg/ml	0.484 ± 0.004	-
0.5 μg/ml	0.446 ± 0.009**	7.8
1 μg/ml	0.452 ± 0.014*	6.6
5 μg/ml	0.389 ± 0.003**	19.6
10 μg/ml	0.330 ± 0.000**	31.8
25 μg/ml	0.247 ± 0.020**	48.9
Alpinia officinarum (80% MeOH)		
0 μg/ml	0.484 ± 0.004	-
0.5 μg/ml	0.467 ± 0.005*	3.5
1 μg/ml	0.452 ± 0.023	6.6
5 μg/ml	0.402 ± 0.004**	16.9
10 μg/ml	0.339 ± 0.000**	29.9
25 μg/ml	0.243 ± 0.002**	49.7
dl--tocopherol 0 M	0.476 ± 0.002	-
10^{-7} M	0.454 ± 0.005**	4.6
10^{-6} M	0.454 ± 0.002**	4.6
10^{-5} M	0.426 ± 0.014**	10.5
10^{-4} M	0.300 ± 0.042*	36.9
Galangin 0 M	0.476 ± 0.002	-
10^{-7} M	0.458 ± 0.023**	3.7
10^{-6} M	0.477 ± 0.004**	0.0
10^{-5} M	0.453 ± 0.004**	4.8
10^{-4} M	0.291 ± 0.012**	38.8

[1] n=3, Significantly different from the positive control group (Student's t-test)
* $p< 0.05$, ** $P <0.01$
[2] % Inhibition =[$OD_{positive}$ - $OD_{sample-blank}$]/ $OD_{positive}$ × 100

Table 3. Inhibitory effect of lipid peroxidation of *Alpinia officinarum* extracts and galangin.

Treatment (/ml or M)		OD_{535nm} Mean ± S.D.	% Inhibition
Alpinia officinarum (70% EtOH)			
	0 μg/ml	0.125 ± 0.008	-
	1 μg/ml	0.122 ± 0.014	2.4
	5 μg/ml	0.120 ± 0.003	4.0
	10 μg/ml	0.108 ± 0.015	13.6
	25 μg/ml	0.104 ± 0.021*	16.8
Alpinia officinarum (80% MeOH)			
	0 μg/ml	0.144 ± 0.009	-
	1 μg/ml	0.124 ± 0.021*	13.8
	5 μg/ml	0.078 ± 0.032*	45.8
	10 μg/ml	0.082 ± 0.008**	43.0
	25 μg/ml	0.045 ± 0.006**	68.7
BHT	0 M	0.157 ± 0.004	-
	10^{-7} M	0.112 ± 0.009*	28.6
	10^{-6} M	0.103 ± 0.007**	34.3
	10^{-5} M	0.061 ± 0.016**	61.1
	10^{-4} M	0.029 ± 0.001**	81.5
Galangin	0 M	0.157 ± 0.004	-
	10^{-7} M	0.152 ± 0.013*	3.1
	10^{-6} M	0.148 ± 0.036	5.7
	10^{-5} M	0.120 ± 0.005*	23.5
	10^{-4} M	0.108 ± 0.039*	31.1

[1] n=3, Significantly different from the positive control group (Student's t-test)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
[2] % Inhibition = [$OD_{positive} - OD_{sample-blank}$] / $OD_{positive} \times 100$

8.27%를 나타내었다. 따라서 양강의 알콜추출물들은 비교적 다량의 galangin을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 한편, 25 μg/ml 농도에서의 프리라디칼소거작용은 70, 100% 에틸알콜, 80, 100% 메틸알콜 추출물이 컸으며 알콜과 같은 중등도 비극성용매에서 활성이 컸다. 또한, 지질과산화억제효과는 80, 100% 메틸알콜추출물이 컸으며 n-부틸알콜, 클로로포름 등도 큰 편으로서 비교적 비극성이 큰 용매가 활성도 컸다.

프리라디칼소거작용

Table 2에서 나타낸 것처럼 양강 70% 에틸알콜추출물, 양강 80% 메틸알콜추출물, galangin 및 dl-α-tocopherol 모두 처리농도에서 유의성이 있는 프리라디칼소거작용을 나타내었으며 양강의 70% 에틸알콜추출물과 80% 메틸알콜추출물의 활성은 서로 비슷하였다. 그러나 대조물질로 사용한 dl-α-tocopherol보다 활성이 높았다. SC_{50}(μg/ml)를 비교해보면 양강 80% 메틸알콜추출물=양강 70% 에틸알콜추출물 < galangin < dl-a-tocopherol 순으로 커졌다. 본 실험은 DPPH free radical의 소거능에 관한 실험으로서 DPPH radical은 ·OH와 비슷한 거동을 하는 데 galangin 및 이를 다량 함유하고 있는 양강추출물은 비교적 강한 프리라디칼소거작용이 있는 것으로 판단되었다.

지질과 산화억제효과

Table 3에서 나타낸 것처럼 양강 70% 에틸알콜추출물, 양강 80% 메틸알콜추출물, galangin 및 BHT 모두 처리농도에서 유의성이 있는 지질과산화억제효과를 나타내었다. 양강의 80% 메틸알콜추출물이 70% 에틸알콜추출물보다 활성이 훨씬 컸다. 그러나 대조물질로 사용한 BHT보다는 활성이 낮았다. IC_{50}(μg/ml)를 비교해보면 BHT < 양강 80% 메틸알콜추출물 < galangin < 양강 70% 에틸알콜추출물 순으로 커졌다. 본 실험은 ethyl linoleate를 사용하여 Fenton reaction에 의해 생성된 ·OH의 지질과산화작용에 대한 억제효과를 관찰하는 것으로서 나타난 결과로 보아 galangin 및 이를 다량 함유하고 있는 양강추출물은 강한 지질과산화억제효과가 있는 것으로 판단되었다.

Pro-oxidant효과

Fig. 2 에서 나타낸 것처럼 galangin은 처리농도에서 pro-

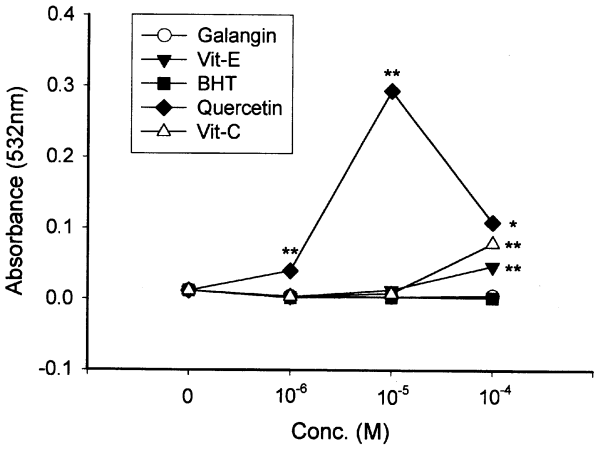

Fig. 2. Pro-oxidant effect of flavonoids on bleomycin-Fe() dependent DNA degradation.

oxidant 효과를 나타내지 않았으나 dl-α-tocopherol과 ascorbic acid의 경우에는 10^{-4}M에서 유의성이 있는 pro-oxidant효과를 나타내었다. 한편, BHT는 전혀 pro-oxidant 활성을 나타내지 않았다. 그러나 galangin과 같은 flavonol 유도체인 quercetin의 경우에는 처리농도를 높이면 pro-oxidant 효과를 나타내었으며 10^{-5}M에 가장 높은 활성을 나타내었고 10^{-4}M에서는 다소 낮아진 biphasic한 경향을 나타내었다. 한편, 양강 70% 에틸알콜추출물은 전혀 pro-oxidant 활성을 나타내지 않았다.(Data not shown)

세포독성억제효과

Fig. 3에 나타낸 것처럼 H_2O_2 유도 세포독성에 대하여 CHL cell과 mouse spleen lymphocyte에 있어서 양강 70% 에틸알콜추출물, galangin 및 dl-α-tocopherol등은 세포독성억제작용을 나타내었다. H_2O_2 10^{-4}M을 단독으로 투여했을 때의 세포생존율을 100%로 하고 검체 10 μg/ml의 처리농도에서 비교해 보았을 때 galangin < 양강 70% 에틸알콜추출물 < dl-α-tocopherol 순으로 CHL cell과 mouse spleen lymphocyte에서 유사하게 활성이 강했다. H_2O_2는 ·OH를 생성하여 농도 의존적으로 세포독성을 나타내는데, galangin 및 이를 다량으로 함유하고 있는 H_2O_2 유도 세포독성에 대하여 억제작용을 나타내었다.

또한, Fig. 3에 나타낸 것처럼 KO_2 유도 세포독성에 대해

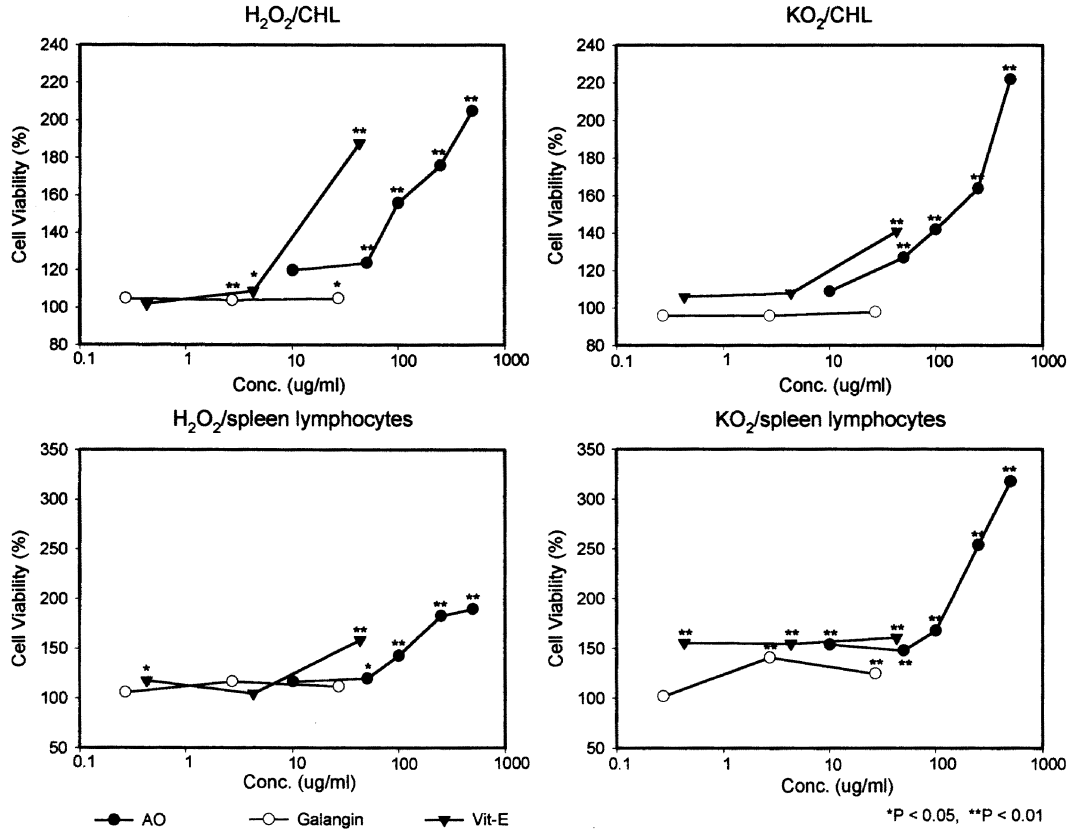

Fig. 3. Cytoprotective effect of 70% ethanol extract of *Alpinia officinarum*(AO) and galangin against H_2O_2 (10^{-4}M) or KO_2(10^{-3}M)-induced cytotoxicity in chinese hamster lung cell (CHL) and mouse spleen lymphocytes.

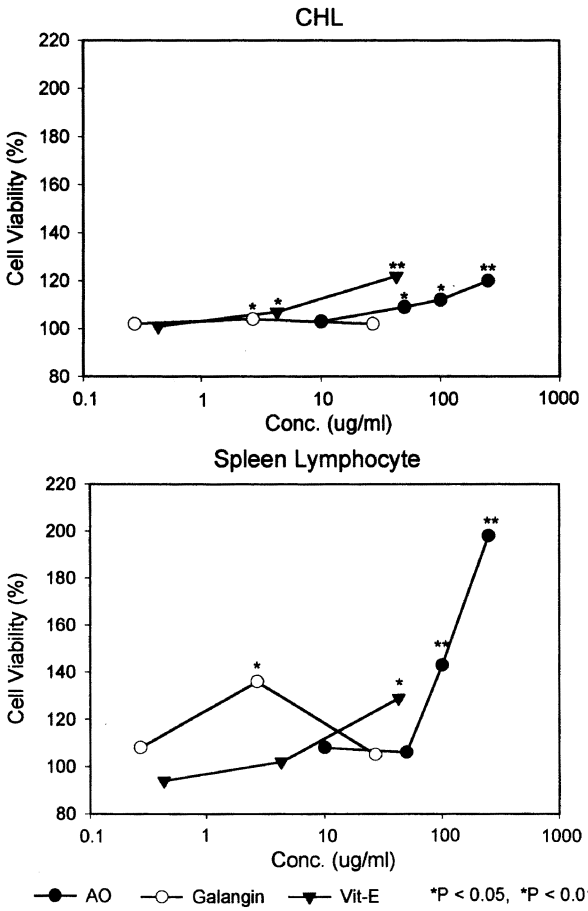

Fig. 4. Cytotoxicity of 70% ethanol extract of *Alpinia officinarum* (AO) and galangin in chinese hamster lung cell (CHL) and spleen lymphocytes

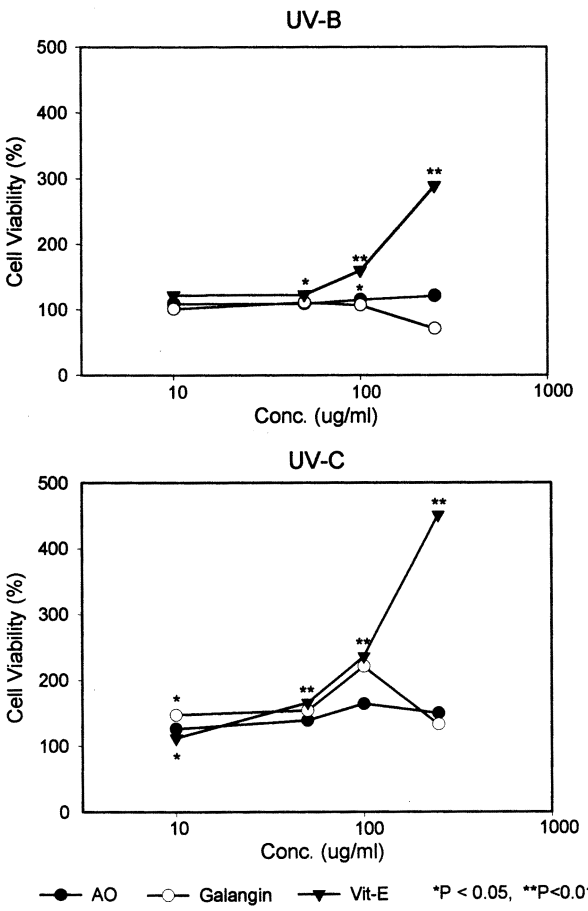

Fig. 5. Cytoprotective effect of 70% ethanol extract of *Alpinia officinarum* (AO) and galangin against ultraviolet B or C-indued cytotoxiciy in NIH/3T3 fibroblast

서도 CHL cell과 mouse spleen lymphocyte에 있어서 양강 70% 에틸알콜추출물, galangin 및 dl-α-tocopherol등은 세포독성억제작용을 나타내었다. KO_2 10^{-3}M을 단독으로 투여했을 때의 세포생존율을 100%로 하고 검체 약 10 μg/ml의 처리농도에서 비교해 보았을 때도 H_2O_2 유도 세포독성때와 마찬가지로 galangin < 양강 70% 에틸알콜추출물 < dl-α-tocopherol 순으로 CHL cell과 mouse spleen lymphocyte에서 유사하게 활성이 강했다. KO_2는 용액 중에서 $O_2^{\cdot-}$을 생성하여 농도 의존적으로 세포독성을 나타내는데, galangin 및 이를 다량으로 함유하고 있는 양강추출물이 H_2O_2 유도 세포독성에 대하여 억제작용과 함께 KO_2 유도 세포독성에 대해서도 억제작용을 나타내었다.

한편, Fig. 4에 배양세포에 용매처리만 하였을 때의 세포생존율을 100%로 하여 소정농도의 검체용액을 처리했을때의 세포생존율변화를 나타내었다. 양강 70% 에틸알콜추출물과 galangin은 dl-α-tocopherol과 마찬가지로 CHL cell 및 mouse spleen lymphocyte에서 그 자체로서는 세포독성을 전혀 나타내지 않았으며 오히려 처리 농도증가에 따라 농도 의존적 세포증식효과를 나타냈다. 이같은 경향은 dl-α-tocopherol이 가장 컸다. 이러한 세포생존율의 증가는 양강추출물, galangin 및 dl-α-tocopherol들이 배양 중에 배지 중 발생되는 각종 산소라디칼등 세포증식을 저해하는 물질들을 소거하기 때문으로 판단된다.

Fig. 5에 NIH/3T3 fibroblast에 있어서 UV-B, 또는 UV-C 유도 세포독성에 대한 억제효과를 나타내었다. UV-B, C 유도 세포독성에 대하여 양강 70% 에틸알콜추출물, galangin 및 dl-α-tocopherol등은 세포독성억제작용을 나타내었다. 양강 70% 에틸알콜추출물과 galangin의 활성은 dl-α-tocopherol 보다 낮았다. UV-B, C는 UV 노출강도에 따라 세포독성을 나타내는데, galangin 및 이를 다량으로 함유하고 있는 양강추출물이 프리라디칼 소거작용과 지질과산화억

Table 4. Protective effect of Alpinia officinarum and galangin on H_2O_2(5×10^{-4}M) or KO_2 (10^{-3}M)-induced oxidative DNA damage in CHL cells

Treatment (μg/ml or M)		H_2O_2[1]		KO_2[1]	
		Tail DNA(%)	Tail length(μm)	Tail DNA(%)	Tail length(μm)
Alpinia	0	25.45 ± 5.64	323.36 ± 32.30	48.77 ± 4.32	283.00 ± 5.21
officinarum	50	29.67 ± 6.20	307.92 ± 21.11	29.56 ± 4.61	256.24 ± 8.00
70% EtOH	100	19.42 ± 3.73	256.60 ± 24.07	19.42 ± 3.73	256.60 ± 24.07
(μg/ml)	250	13.10 ± 7.34	189.44 ± 56.01	17.50 ± 6.432	28.40 ± 25.10*
	500	5.48 ± 4.94**	146.76 ± 41.49*	16.70 ± 2.57*	157.68 ± 15.53*
Galangin	0	45.45 ± 4.44	300.36 ± 49.96	48.77 ± 4.32	283.00 ± 5.21
(M)	10^{-8}	25.50 ± 4.66	268.32 ± 31.64	34.11 ± 5.11	277.60 ± 18.38
	10^{-7}	23.51 ± 13.81	227.72 ± 62.81	22.90 ± 4.48	244.60 ± 14.94
	10^{-6}	23.39 ± 6.20	210.84 ± 16.58	17.15 ± 3.15*	224.28 ± 2.28*
	10^{-5}	15.34 ± 4.09**	186.12 ± 25.59*	13.00 ± 2.32**	159.64 ± 27.93*

[1]n=3, Mean ± S.D. *,** Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Student's t-test).

제작용을 크게 나타낸 것처럼 UV-B, C유도 세포독성에 대하여 억제작용을 나타내었다. 한편 NIH/3T3 fibroblast에 있어서 양강 70% 에틸알콜추출물, galangin 및 dl-α-tocopherol 은 처리농도증가에 따른 세포독성을 나타내지 않았고, 농도증가에 따른 유의성 있는 세포생존율의 증가를 나타내었다(Data not shown).

산화적 DNA 손상에 미치는 영향

Single cell gel electrophoresis(SCGE)에 의한 양강 70% 에틸알콜추출물과 galangin의 산화적 DNA손상억제활성을 Table 4에 나타내었다. H_2O_2 유도 또는 KO_2 유도 DNA 손상에 대하여 양강추출물과 galangin은 농도의존적인 억제 활성을 나타내었다. H_2O_2 유도에 대하여 양강추출물 500 μg/ml에서 tail DNA와 tail length의 경우 각각 78.4%, 54.6%의 억제활성을 나타내었다. Galangin은 10^{-5} M(= 2.7 μg/ml)에서 tail DNA와 tail length의 경우 각각 66.2%, 38.0%의 억제활성을 나타내었다. 한편, KO_2 유도에 대해서는 양강추출물 500 μg/ml에서 tail DNA와 tail length의 경우 각각 65.7%, 44.2%의 억제활성을 나타내었다. Galangin은 10^{-5}M(= 2.7 μg/ml)에서 tail DNA와 tail length의 경우 각각 73.3%, 43.5%의 억제활성을 나타내었다. 따라서 양강추출물과 galangin은 ·OH 및 O_2^{-}에 의한 DNA single strand break를 농도의존적으로 억제하는 DNA 산화적 손상억제제로서 작용하였다.

소핵시험

Adriamycin에 의한 양강추출물과 galangin의 염색체 손상에 의한 소핵생성의 억제활성을 Table 5에 나타내었다. 양강추출물과 galangin은 용량의존적인 억제 활성을 나타내었다. 양강추출물이 조추출물임에도 불구하고 50-400 mg/kg의 투여농도에서 억제활성이 나타내었으며 400 mg/kg에서 33.5%의 억제활성을 나타내었다. 함유성분인 galangin도 100 mg/kg에서 31.6%의 억제활성을 나타내었다. 양강추출물은 조추출물임에도 불구하고 억제활성이 높은 경향을 나타내었다. 따라서 양강추출물은 O_2^{-}을 생성하여 유전독성을 나타내는 adriamycin에 의한 유전독성을 억제하는 염색체 손상억제제로서 작용하였다.

Table 5. Effect of *Alpinia officinarum* extract and galangin on the frequency of MNRETs by adriamycin (5mg/kg, i.p.)

Treatment	MNRETs / 1,000 RETs[1]						
(mg/kg, p.o.)	Ind. Value						Mean ± S.E.
Alpinia	0	28	34	27	30	36	31.0 ± 1.73
officinarum	50	26	48	38	49	23	36.8 ± 5.39
(70 % EtOH)	100	24	35	23	28	25	27.0 ± 2.16
	200	12	12	14	6	9	10.6 ± 1.40**
	400	18	21	24	20	20	20.6 ± 0.97**
Galangin	0	30	35	16	38	42	32.2 ± 4.49
	0.1	53	36	32	44	15	36.0 ± 6.36
	1	27	28	20	20	32	25.4 ± 2.35
	10	32	14	20	25	30	24.2 ± 3.29
	100	35	16	11	22	26	22.0 ± 4.13

*,** Significantly different from the control group (0mg/kg) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Student's t-test).
[1] MNRET : Micronucleated reticulocyte, RET : Reticulocyte

고 찰

최근 galangin에 대한 연구관심이 높아지고 있다.[13] 특히 galangin의 항산화활성에 관한 보고로서는 low oxidation

potential(1.5V)를 갖고 있어 지질과산화억제효과가 강하다고 하고[14], 여러가지 flavonoid 중 가장 LDL의 과산화방지효과가 컸다고 보고하였다.[15] 또한, galangin은 CCl_4 유도 microsomal lipid peroxidation도 강하게 억제시키고 있다고 보고하였다.[16] 한편, galangin의 암예방에 관련된 활성으로는 murin hepatoma cell에서 anticarcinogenic marker enzyme인 quinone reductase의 활성을 증가시킨다는 것도 보고되어 있다.[17] Galangin은 human breast cancer cell의 증식을 억제하고[18], sulfation induced carcinogenesis를 억제하며[19], multidrug-resistant breast cancer cell에서 p-glycoprotein mediated efflux를 증가시켜 증가된 efflux가 DMBA의 burden을 감소시켜 cancer risk 를 감소 시킨다는 보고도 있다.[20] 한편, 건강보조식품성분인 프로폴리스(propolis)가 galangin함량이 매우 높은 것으로 알려져 있으며[21], propolis의 항박테리아[22], 항바이러스작용[23], 항염증작용[24]이 보고되고 있다.

양강(*Alpinia officinarum*) 근경의 100% 에틸알콜 추출물 중에 galangin은 9.6%, 100% 메틸알콜 추출물 중에 8.27%, 아세톤 추출물 중에 16.84%, 에틸아세테이트 추출물 중에 16.84%로서 다량 함유되어 있었다(Table 1). 따라서 양강은 galangin의 주요 식물자원으로 평가되었다. 특히, 양강으로부터 제조한 식품제조용 용매인 70% 에틸알콜추출물과 함유 galangin은 지질과산화억제활성(Table 2)과 프리라디칼소거작용(Table 3)을 나타내었으며, H_2O_2, KO_2 또는 UV-B, C 유도 세포독성에 대해서도 억제적으로 작용하여 세포독성보호작용을 나타내었다(Fig. 3). 한편, H_2O_2유도 또는 KO_2유도 DNA 손상에 대하여 양강추출물과 galangin은 농도의존적인 억제 활성을 나타내었다(Table 4). 또한, 양강추출물은 superoxide anion을 생성하여 유전독성을 나타내는 adriamycin에 의한 유전독성을 억제하는 염색체 손상억제제로서 작용하였다(Table 5).

Galangin과 이를 다량 함유한 양강추출물의 프리라디칼소거효과와 지질과산화 억제효과는 hydroxyl 및 peroxy radical들을 소거하고, Fe이온들을 빼앗아 Fenton reaction을 억제하는 것으로 판단된다.[25] 또한 galangin의 superoxide 소거작용은 flavonoid들의 one-electron transfer mechanism[26], 또는 converted mechanism을 경유하여 superoxide 이온과 반응한 것 때문으로 판단된다.[27] Table 4에서 나타낸 것처럼 quercetin과 같은 flavonoid는 Fe^{3+}-bleomycin-DNA complex를 Fe^{2+}형태로 환원시켜 bleomycin-dependent DNA damage를 촉진시킬 수 있다.[28] 따라서 페놀성 화합물도 화합물의 구조에 따라서 pro-oxidant효과를 가질 수도 있다. 그러나 양강추출물 중 다량 함유된 galangin은 quercetin과는 달리 전혀 pro-oxidant효과를 나타내지 않았다. 한편, UV-B, C는 세포의 과산화물질생성을 통하여 DNA에 손상을 준다.[29] 이러한 손상이 적절히 수복되지 않으면 유전자돌연변이와 피부암을 유발하게 된다.[30] 그러므로 UV-B, C에 의한 세포독성을 억제할 수 있는 항산화 물질들은 photo-carcinogenesis에 대한 억제효과가 있다고 보여진다.[31] 따라서 양강추출물과 galangin은 이같은 UV 유도 광독성에 대한 보호물질로서의 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

ROS에 의한 oxidative DNA damage는 암과 노화와 관련이 깊다.[32] 이들은 point mutation이나 deletion을 포함하는 돌연변이를 nuclear DNA에서 일으키며 mitochodrial DNA에서의 oxidative damage는 노화세포에서의 에너지결핍을 일으켜 나이에 따라 돌연변이의 축적이 일어난다.[33] 따라서 DNA 수복의 결핍은 세포사를 일으키고 이것은 인접세포들에 있어서 carcinogenesis로의 촉진적 자극을 일으키게 한다.

산화적 DNA손상을 통하여 발암의 전단계에서 일어나는 돌연변이나 염색체 손상등의 유전독성에 대한 억제물질들은 암의 개시, 촉진 및 진전단계에서 항산화반응을 통한 세포내 대사의 조절, DNA 반응성 물질들의 차단, DNA 복제나 DNA 수복작용과 같은 기전으로 돌연변이나 염색체 손상 및 암을 예방할 수 있는 것으로 기대되고 있다.[34] 양강추출물과 함유주성분인 galangin은 지질과산화억제작용과 $^{\cdot}OH$와 $O_2^{\cdot-}$ 등을 소거함으로서 SCGE로 검출되는 DNA single strand breakage와 같은 산화적 스트레스에 대한 보호작용을 하고 있다. 또한 마우스 소핵시험에 의하여 adriamycin과 같은 $O_2^{\cdot-}$ 유발물질에 의한 염색체 수준에서의 손상에 대해서도 양강추출물과 galangin은 억제효과를 나타내었다. 따라서 양강추출물과 함유 galangin은 산화적 DNA손상이나 염색체 손상 억제를 통한 항노화 및 암예방제로서의 가능성이 있다고 판단된다.

이와 같은 결과들을 종합해볼 때 양강으로부터 제조한 양강 70% 에틸알콜추출물과 이 추출물에 다량 함유된 galangin은 프리라디칼소거작용과 지질과산화억제활성을 나타내었으며, H_2O_2 또는 KO_2유도 세포독성에 대해서도 억제적으로 작용하여 세포보호효과를 나타내었다. 또한, DNA single strand breakage와 염색체 수준에서의 손상에 대해서도 양강추출물과 galangin은 억제효과를 나타내었다. 따라서 양강추출물은 산소프리라디칼들에 의한 산화적 손상에 억제적으로 작용하는 기전을 활용하여 항산화성 스트레스를 통한 항노화, 암예방제로서의 응용가능성이 높은 식물추출물로서 향후 기능성 식품성분으로서의 응용가능성이 있는 것으로 판단되었다.

감사의 말씀

이 논문은 1999 년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 지원되었음 (KRF-99-041-F00310)

국문요약

양강추출물 (*Alpinia officinarum*, 70% ethanol extract)과 함유 주성분인 galangin은 프리라디칼소거작용과 지질과산화억제활성을 나타내었으며, H_2O_2 또는 KO_2유도 세포독성에 대해서도 억제적으로 작용하여 세포보호효과를 나타내었다. DNA single strand breakage와 같은 산화적 스트레스에 대해서도 보호작용을 하고 있다. 또한, 마우스 소핵시험에 의하여 adriamycin과 같은 superoxide유발물질에 의한 염색체 수준에서의 손상에 대해서도 억제효과를 나타내었다. 양강추출물은 galangin을 유효성분으로하여 산소프리라디칼들에 의한 산화적 손상에 억제적으로 작용하는 기전으로 산화적 스트레스에 대한 항노화, 암예방제로서의 응용가능성이 높은 추출물로서 향후 기능성 식품으로서의 응용가능성이 높을 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Ductile, G. and Crozier, A.: Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **3**, 447-451 (2000).
2. Marnett, L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21**, 361-370 (2000).
3. Lin, J.K. and Tsai, S.H.: Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China*, **23**, 99-106 (1999).
4. Inagake, M., Yamane, T., Kitao, Y., Oya, K., Matsumoto, H., Kikuoka, N., Nakatani, H., Takahashi,T., Nishimura, H. and Iwashima, A.: Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat. *Japan J. Cancer Res.* **86**, 1106-1111 (1995).
5. 소학관편:중약대사전 제2권, 상해과학기술출판사, 상해, pp 782 (1985).
6. Fugita,Y., Uera, I., Morimoto, Y., Nakajima,M., Hatano, C. and Okuda,T.: Studies on inhibition mechanism of auto-oxidation by tannins and flavonoids. *Yakugaku Zasshi*, **108**, 129-135 (1988).
7. Ohtka,H., Ohishi, N. and Yaki, k.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal.Biochem.*, **95**, 351-358(1979).
8. Kitta, K., Hagiwara, Y. and Shibamoto, T.: Antioxidative activity of an isoflavonoid, 2"-o-glycosylisovitexin isolated from green barley leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1843 (1992).
9. Okezie, I. K., Antoniam M., Johnm B. and Barry H.: Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1880-1885 (1993).
10. Cole, S. P. C.: Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **17**, 259 (1986).
11. 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**, 184-191(1988).
12. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, T., Sofuni, T. and Ishidate, Jr, M.: The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.*, **278**, 209-213(1990).
13. Heo, M.Y., Sohn, S.J. and Au, W.W.: Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat. Res.*, **488**, 135-150(2001).
14. Rapta, P., Misik, V., Stasko, A. and Vrabel, I.: Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 901-908 (1995).
15. Myara, I., Pico, I., Vedie, 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**(2), 69-73 (1993).
16. Cholbi, M. R., Paya, M. and Alcaraz, M. J.: Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl_4-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia*, **47**(2), 195-199 (1991).
17. 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**(2), 213-216 (1997).
18. So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F. and Caroll, K.K.: Inhibition of proliferation of estrogen recepter-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett.*, **112**(2), 127-133(1997).
19. Eaton, E. A., Walle, U. K., Lewis, A. J., Hudson, T., Wilson, A. A. and Walle, T.: Flavonoids, potent inhibitors or the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab. Dispos.*, **24**(2), 232-237 (1996).
20. Phang, J. M., Poore, C. M., Lopaczynska, J. and Yeh, G. .. : Flavonol-stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in multidrug-resistant breast cancer cells, *Cancer Res.*, **53**(24),

5977-5981(1993).
21. Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A., Ikegaki, M., Cury, J.A. and Rosalen, P. L.: Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol*., **36**(1), 24-28 (1998).
22. Afolayan, A. J. and Meyer, J. J.: The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of Helichrysum aureonitens. *J. Ethnopharmacol*., **57**(3), 177-181 (1997).
23. 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**(2), 165-169(1997).
24. Krol, W., Scheller, S., Czuba, Z., Matsuno, T., Zydowicz, G., Shani, J. and Mos, M.: Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis(EEP) and its phenolic components. *J. Ethnopharmacol*., **55**(1), 19-25 (1996).
25. Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K. and Kikugawa, K.: Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biol. Pharm. Bull*., **19**, 558-563(1996).
26. Noda, Y., Anzai, K., Mori, A., Kohno, M., Shinme, M. and Packer, L.: Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem. Mol. Biol. Int*., **42**(1), 35-44(1997).
27. Afanas'ev, I.B. and Polozova, N.I.: One electron oxidation of p- and o-dihydroxy benzenes by oxygen radical anion in aprotic medium. *Zh. Organ. Khim*., **26**, 1013-1016(1978).
28. Miranda, J.L., Barry, H., Patricia, J.E. and Robin, S.H.: Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology*, **38**(17), 2859-2865 (1989).
29. Cadet, J., Douki, T., Pouget, J.P., Ravanat, J.L. and Sauvaigo, S.: Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. *Curr. Probl. Dermatol*., **29**, 62-73(2001).
30. Hemminki, K, Xu, G. and Le Curieux, F.: Ultraviolet radiation-induced photoproducts in human skin DNA as biomarkers of damage and its repair. *IARC Sci Publ*., **154**, 69-79 (2001).
31. Heo, M.Y., Kim, S.H., Yang, H.E., Lee, S.H., Jo, B.K. an Kim, H.P.: Protection against ultraviolet B- and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of Prunus persica extract. *Mutat. Res*., **496**(1-2), 47-59 (2001).
32. Ames, B.N.: Endogeneous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutation Res*. **214**, 41(1989).
33. Ames, B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science*, **221**, 1256 (1983).
34. Flora, S., Bronzetii, G. and Sovels, F.H.: Assesment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Mutation Res*. **267**, 153-155 (1992).