

## 식품소재 라이브러리를 이용한 천식 완화용 물질의 초고속스크리닝 기법 개발

허진철 · 박자영 · 권택규<sup>1</sup> · 정신교 · 김성욱<sup>2</sup> · 이상한<sup>†</sup>

경북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>계명대학교 면역학교실, <sup>2</sup>한국생명공학연구원 세포기능조절연구실

### Development of High Throughput Screening Techniques Using Food-borne Library against Anti-asthma Agents

Jin-Chul Heo, Ja-Young Park, Taeg Kyu Kwon<sup>1</sup>, Shin Kyo Chung, Sung-Uk Kim<sup>2</sup> and  
Sang-Han Lee<sup>†</sup>

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Department of Immunology, Keimyung University School of Medicine, Daegu 700-712, Korea

<sup>2</sup>Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-333, Korea

#### Abstract

Oxidant stress is a well-known pivotal parameter for the degenerative immune diseases including asthma, atopic dermatitis, and rhinitis. In order to screen for anti-asthma agents effectively, we first established the infrastructure of high throughput screening(HTS) for anti-oxidant agents from agricultural products and/or oriental medicine library extracted with water, methanol, dimethyl sulfoxide, ethyl acetate and juice. Using the screening system, we found that *Chaenomelis langenariae*, *Rhus javanica* L., *Camellia sinensis*, *Helianthus annuus* and *Angelica utilis* Makino had strong anti-oxidant activity. Moreover, *Helianthus annuus*, *Rehmannia glutinosa* Libo and *Angelica utilis* Makino have protection activities by treatment of an oxidant hydrogen peroxide. Together, these results suggest that screened agents could be potential agents against asthma, although the *in vivo* studies should be clearly tested.

**Key words :** High throughput screening, anti-asthma agents, library, establishment

#### 서 론

최근의 새로운 식품의약의 개발은 크게 두 가지의 관점에서 주목 할 수 있는데 이는 시간과 비용의 측면이다. 이를 두 가지의 측면을 만족시킬 수 있는 것이 자동화(automation)인데, HTS(high throughput screening) system은 시간의 단축과 비용의 절감이라는 두 가지 측면을 만족시켜주는 유용한 방법으로 알려져 있다(1-2).

HTS system의 최대 장점은 단위시간에 동일한 방법의 실험을 많은 후보물질을 이용하여 할 수 있다. 많은 수를 가진 96/384/1536 등의 microplate를 사용함으로서 보다 적은 공간에서 많은 양의 실험이 가능하며, 또한 micropipettor

의 사용으로 적은 양의 reagent를 사용 할 수 있는 장점이 있다(3). 이러한 과정을 자동화함으로서 이전의 고전적이며 수동적인 작업에 의한 시간의 절약을 가져올 수 있으며, 장비와 기구에 의해 실험의 정밀도를 높임으로서 그 비용을 크게 줄일 수 있는 이점이 있다(4).

파민성 염증반응의 대표적인 질환으로서 천식(asthma)을 들 수 있다. 이는 아토피성 피부염, 발진, 기관지 천식, 알러지성 비염 등과 함께 중요한 allergy 질환으로 알려져 있다. 최근 천식의 발병율은 급증하는 현상을 보이고 있는데, 이는 공업화에 따른 대기오염의 영향 등이 큰 것으로 알려져 있다(5-6). 면역적인 파민 반응의 제반 증상(재채기, 콧물, 감기증세, 그리고 가려움증)외에 심지어 정맥동염(sinusitis)이나 천식과 같은 심각한 호흡기 만성질환으로 연결되어 생명에 지장을 초래 할 수 있는 것으로 알려져 있다(7). 산화스트레스(oxidant stress)는 대표적으로 superoxide

\*Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,  
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

anion ( $O_2^-$ )와 hydro radical ( $OH$ ) 등이 있는데 이들 물질은 공유전자쌍을 가지지 않기 때문에 매우 불안정한 분자들이다. 생물학적으로 산화스트레스에 노출이 되면 전자전달계 (mitochondria의 전자전달계, phagocyte의 활성)에 이상을 유발할 수 있는데, 이는 외부적인 요인(꽃가루, 담배연기 등)에 의한 경우가 많다. 생물체 내에서는 허파나 산소의 2차대사에 영향을 주게 되며, 최종적으로 이는 단백질, DNA, 지방 등의 대사에 영향을 준다(8).

산화스트레스는 천식과 밀접한 관련성을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 그 대표적인 것이 산화스트레스에 의한 염증반응이다. 염증반응은 천식의 초기에 나타나는 대표적인 증상이다(9-10). 호흡기 질환 환자에 있어 oxidant 와 anti-oxidant의 비율이 정상인에 비해 불균형하게 나타나는 것으로 보고된 바 있는데, 치료의 면에서 superoxide의 저해물질인 superoxide dismutase (SOD)가 호흡기 질환을 완화시켜주는 것으로 알려져 있으며, 치료의 목적으로 anti-oxidant가 이용될 수 있다는 보고도 있다(11-12). Reactive oxygen species (ROS)는 면역계통에서도 이상을 유발하는 것으로 알려져 있어 이를 억제하는 물질을 식품에 첨가하려는 보고도 많이 있다(13-15). 그러나 천식에 대한 치료 방법으로는 많은 경우 대증요법에 의존하여, 기관지 천식이 발생하였을 경우에는 기관지 확장제를 사용하거나 항히스타민제를 사용하여도 일시적으로 증세를 완화시켜주는 작용만이 있을 뿐이며, 근원적인 치료방법이 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 천식과 관련한 치료제를 개발하기 위한 일련의 과정 중 기능성 천식 완화 식품소재를 농산물(농산식품, 원예식물, 한약식물류 등)로부터 개발하고자 먼저 항산화제에 관련된 HTS system을 구축하고 이를 이용하여 식품소재 라이브러리로부터 활성이 인정되는 몇 가지의 추출물을 얻을 수 있었기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 재료로서 한약재의 경우 서울 경동시장의 한약상회에서 공급받아 실험에 사용하였으며, 농산물과 일부 한약재의 경우는 한국생명공학연구원 내의 자생식물이용개발사업단 한국식물추출은행에서 구입 후 사용하였다.

실험에 사용된 시약으로는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; St. Louis, MO), ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ; Sigma No. St. Louis, MO), linoleic acid (Sigma No. St. Louis, MO), 2-deoxy-D-ribose (Sigma No. St. Louis, MO), CCK-8 kit (water-soluble tetrazolium salt; 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt; DOJINDO, Kumamoto,

Japan) 등이 사용되었다.

### 식품소재용 라이브러리의 조제

서울 경동시장으로부터 구입한 한약재 200여종과 한국식물추출은행으로부터 구입한 50여종의 재료를 각각 용매 별로 다르게 추출을 하여 약 1,000여개의 library를 제작하였다. 한약재와 건과류는 증류수, DMSO, ethyl alcohol, methyl alcohol, ethyl acetate를 이용하여 24시간동안 추출과정(0.1-0.5 g/mL)을 거쳤으며, 증류수 추출물은 섭씨 60°C에서 열수 추출을 하였다. 채소류의 경우는 막자사발을 이용하여 파쇄 후 그 추출액을 이용하였다. 이 후 HTS가 적용 가능한 well plate로 옮긴 다음 -20°C에 보관 후 실험에 사용하였다 (Table 1).

Table 1. A list of natural products for anti-asthma agent screening

No	Scientific name	Korean name	Extract condition				
			DW <sup>1)</sup>	DM	EM	ME	EA
1	<i>Acanthopanax senticosus</i>	오가피	.	.	.	.	.
2	<i>Achyranthes japonica</i>	우슬	.	.	.	.	.
3	<i>Aconiti Kusnezoffii Radix</i>	초오	.	.	.	.	.
4	<i>Aconiti Tuber</i>	천오	.	.	.	.	.
5	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	부자(당포)	.	.	.	.	.
6	<i>Acori graminei</i> Rhizoma	석창포	.	.	.	.	.
7	<i>Aecilomyces tenuipes</i>	누에	.	.	.	.	.
8	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb	선학초	.	.	.	.	.
9	<i>Akebiae caulis</i>	목통	.	.	.	.	.
10	<i>Alisma canaliculatum</i>	택사	.	.	.	.	.
11	<i>Allii tuberosi</i> Semen	구자	.	.	.	.	.
12	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	노희	.	.	.	.	.
13	<i>Alpiniae officinarum</i> Rhizoma	양강	.	.	.	.	.
14	<i>Ammomi tsao-ko</i> Fructus	초과	.	.	.	.	.
15	<i>Anomoi cardamomi</i> Fructus	백두구	.	.	.	.	.
16	<i>Amomum xanthoides</i> Wallich	사인	.	.	.	.	.
17	<i>Amydae carapax</i>	별갑	.	.	.	.	.
18	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	지모	.	.	.	.	.
19	<i>Angelica gigas</i> Nakai	잎당귀	.	.	.	.	.
20	<i>Angelica utilis</i> Makino	신선초	.	.	.	.	.
21	<i>Angelicae dahuricae</i> Radix	백지	.	.	.	.	.
22	<i>Anthriscs aemula</i> Schisch	전호	.	.	.	.	.
23	<i>Aphis gossypii</i> Grover	견포도	.	.	.	.	.
24	<i>Apium graveolens</i>	샐러리	.	.	.	.	.
25	<i>Arachis hypogaea</i> L.	땅콩	.	.	.	.	.
26	<i>Araliae cordatae</i>	독활	.	.	.	.	.
27	<i>Arecae pericarpium</i>	빈당	.	.	.	.	.
28	<i>Arisaematis rhizoma</i>	남성	.	.	.	.	.
29	<i>Aristolochiae fructus</i>	마두령	.	.	.	.	.
30	<i>Armeniacae semen</i>	행인	.	.	.	.	.
31	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	인진	.	.	.	.	.
32	<i>Asarum sieboldii</i> Miquel var.	세신	.	.	.	.	.
33	<i>Asini gelatinum</i>	아교	.	.	.	.	.
34	<i>Asparagus cochinchinensis</i> Merr.	천문동	.	.	.	.	.

<sup>1)</sup>Abbreviation : Dw ; distilled water, DMSO ; dimethyl sulfoxide, EM ; ethanol, ME ; methanol, EA ; ethyl acetate and Ju ; juice.



151	Juncus effusus var.	동심초						
152	Kalopanax pictum Nakai	해동피						
153	Lactuca sativa	청오클립						
154	Lactuca sativa L.	풀라로사						
155	Lactuca sativa Linn.	상추						
156	Leonurus sibiricus L.	익모초						
157	Ligustici rhizoma	천궁						
158	Ligustrum obtusifolium	여정실						
159	Lilium speciosum Thunb.	백합						
160	Lindera strychnifolia F. Villars.	오약						
161	Linum usitatissimum L.	아마자(이마인)						
162	Lithospermum erythrorhizon Sieb.	자초						
163	Lonicera japonica Thunb	인동초(잎)						
164	Lonicera japonica Thunb.	금은화(꽃)						
165	Lycium chinense Miller.	구기자						
166	Lycocionum pseudo-leaf Nakai var.	진교						
167	Lycopus lucidus Turcz.	향유						
168	Lycoris radiata Maxim.	선모						
169	Lygodium japonicum	해금사						
170	Magnolia obovata Thunb.	후박						
171	Magnoliae Flos	신이화						
172	Malva verticillata L.	아욱						
173	Matrii sulfas	망초						
174	Melia azedarach L.	고珑피						
175	Melissa officinalis	밤						
176	Mentha arvensis L. var.	백하						
177	Morus alba Linne	상백피						
178	Mucunae caulis	계절동						
179	Mume fructus	오매						
180	Myristica fragrans Houttuyn	우두구						
181	Nelumbo nucifera	연자육						
182	Nelumbo nucifera Gaertner	백련						
183	Oenanthe decumbens Kpol	미나리						
184	Ophiopogon japonicus Ker-Gaoler.	맨문동						
185	Ostericum koreanum Kitagawa	강활						
186	Ostrea gigas	모려						
187	Otelia alismoides L.	용설초						
188	Paeonia albiflora Pallas var.	적작약						
189	Paeonia suffruticosa Andrews.	목단피						
190	Panax notoginseng	삼칠근						
191	Panonychus citri McGregor	탱자						
192	Perilla frutescens Britton var.	소엽						
193	Perilla frutescens	깻잎						
194	Persicae semen	도인						
195	Petroselinum crispum	향나물						
196	Pharbitis nil Choisy.	흑축						
197	Phaseoli angularis	적소두						
198	Phellodendron amurense Rupr.	황백						
199	Phragmites communis Trin.	노근						
200	Phytolacca esculenta Van Houtte.	상우						
201	Pinellia ternata Breit.	반하						
202	Pinus koraiensis	잣						
203	Piperis nigri Fructus	호초						
204	Pistacia vera	파스타치오						
205	Plantago asiatica L.	차전						
206	Platycodon grandiflorus A.	길경						
207	Polygala tenuifolia L.	원지						
208	Polygonatum odoratum Druce var.	옥죽(동굴례)						
209	Polygonum aviculare L.	편축						
210	Polygonum multiflorum Thunb.	적하수오						
211	Polypori umbellati Polyporaceae	복령피						
212	Poncirus trifoliata Rafin	자실						
213	Poria cocos Wolf.	백복령						
214	Prunus nakaai Lev.	욱리인						
215	Psoralea corylifolia L.	파고지						
216	Pueraria thunbergiana	갈근						
217	Puerariae flos	갈화						
218	Quisqualis indica L.	사군자						
219	Raphanus sativus Linne	내복자						
220	Rehmannia glutinosa Libo	시금치						
221	Rehmannia glutinosa Liboschitz	숙지황						
222	Reynoutria japonica Houtt	호장근						
223	Rheum coreanum Nakai	대황						
224	Rhus javanica L.	오배자						
225	Rosae laevigatae	금행자						
226	Rubia cordifolia L. var.	천초						
227	Rubus coreanus	복분자						
228	Sabina chinensis Antoine	자단향						
229	Salvia miltorrhiza Bunge	단삼						
230	Sanguisorba officinalis L.	지유						
231	Santalum album L.	백단향						
232	Saposhnikovia divaricata Schischk.	방풍						
233	Schisandra chinensis Baillon.	오미자						
234	Schizonepeta tenuifolia Brig	형개						
235	Scirpus maritimus L.	삼릉						
236	Scrophularia takesimensis Nakai	현삼						
237	Scutellaria baicalensis Geogr.	황금						
238	Sesamum indicum L.	호마인						
239	Siegesbeckia glabrescens Makino	회침						
240	Solanum melongena L.	가지						
241	Sophora angustifolia Sieb.	고삼						
242	Spilodela polyrhiza L.	부평초						
243	Stemona japonica Miquel.	백부근						
244	Styphnolobium japonicum Schott	괴화						
245	Styrax tonkinensis Craib.	안식향						
246	Taraxacum platycarpum	민들레						
247	Teucrium veronicaeformis Max.	곽향						
248	Thuja orientalis L.	백자인						
249	Tilia taquetii Schneid.	뽕잎(상업)						
250	Triticum sativum Lamarck	소맥						
251	Trichosanthus kirilowii Maxim.	과루인						
252	Trigonella foenum-graecum L.	우방자						
253	Tropaeoli excrementum	오령지						
254	Tsuga sieboldii	솔잎						
255	Typea pollen	포황						
256	Ulmus davidiana var.	유근피						
257	Uncaria ramulus cum Uncis	조구						
258	Viscum coloratum	상기생						
259	Vitex rotundifolia L. fil	만형자						
260	Zea mays L.	옥발						
261	Zingiber nigrum Gaertner	익지인						
262	Zingiber officinale Rose	건강						
263	Zizyphi spinosi	산조인						
264	Ziziphus jujuba Miller var.	대조						

### HTS(High throughput screening) 구축

HTS를 이용한 hit 검색을 위하여 한국생명공학연구원에 설치되어 운용하고 있는 시스템을 사용하였다. Liquid handler (CyBio, Jena, Germany), multi-label counter (VICTOR2, Wallac, Turku, Finland)와 robotic arm (Thermo-CRS, Burlington, Canada) 등이 사용되었다. 이 3종의 기기는 automation software (POLARA)로 조합이 되어 있어서 적은 공간에서 대량의 물질을 검색하기에 최적으로 설치되어 있다(Fig. 1).



Fig. 1. Overview of HTS (high throughput screening) facility.

### DPPH assay

DPPH radical 소거활성능 측정은 이전에 보고된 방법을 응용하여 실험을 하였다. 각 추출물의 시료를 10  $\mu$ L와 0.2 mM DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 190  $\mu$ L를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 다음과 같이 계산 ( $\% \text{ inhibition} = [A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}] \times 100$ )을 하였다(16).

### Ferric ion reducing antioxidant power(FRAP) assay

실험을 위한 반응액으로는 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) : 20 mM의  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 실험직전에 만들어 사용을 하였다. 반응액 (190  $\mu$ L)과 추출물 (10  $\mu$ L)을 혼합한 후 100초 간격으로 약 15분간 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 시간에 따른 상대비교를 하였으며, 재료별 활성정도는 15분 후의 값을 기준으로 하였다(17).

### Hydroxyl radical (HO) scavenging assay

Hydroxyl radical 소거 활성은  $\text{Fe}^{\text{II}}$ 와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 반응하는 Fenton 반응을 이용하여 2-deoxyribose를 산화시켜 MDA (malondialdehyde)로 분해시킬 때 나오는 MDA를 530 nm에서 측정하여 활성을 알아보았다. 반응액으로는 50 mM의  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 50 mM의 EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) : 50 mM 2-deoxyribose를 1 : 1: 2의 비율로 혼합한 다음 반응액 (190  $\mu$ L)과 시료 (10  $\mu$ L)를 섞었다. 이후 100

mM phosphate buffer (pH 7.4)와 50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 적당량 넣은 후 37°C에서 4시간 동안 방치한 다음 TCA (trichloroacetic acid)와 TBA(2-thiobarbituric acid)를 반응물에 첨가하였다. 100°C에서 15분 동안 가열 후 얼음 속에서 급속히 냉각하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 정도는 시료를 넣지 않은 군을 대조군으로 % 비율로 나타내었다(18).

### Linoleic acid에 대한 항산화 활성

Linoleic acid 항산화 활성 실험은 linoleic acid를 기질로 하여 과산화지질을 억제하는 방법을 이용하여 실험에 응용을 하였다. 과산화지질 (Linoleic acid)에 의해  $\text{Fe}^{\text{II}}$ 가  $\text{Fe}^{\text{III}}$ 로 산화가 되고 이때  $\text{Fe}^{\text{II}}$ 의 반응물인 ammonium thiocyanate을 넣어 이를 ELISA에서 정량을 한 것이다. 반응은 과산화지질 (linoleic acid)에 의해  $\text{Fe}^{\text{II}}$ 가  $\text{Fe}^{\text{III}}$ 로 산화되게 되고  $\text{Fe}^{\text{III}}$ 는 ammonium thiocyanate와 반응해서 붉은색으로 변하게 되는데 이것을 490 nm에서 정량한 것이다. 시료 (10  $\mu$ L)와 linoleic acid (100  $\mu$ L)를 혼합한 다음 50 mM sodium phosphate buffer (100 $\mu$ L)를 넣고 40-60°C의 암소에서 반응시켰다. 반응물은 각각 시간별로 취하여 반응을 정지시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(19).

### Hydrogen peroxide에 의한 세포사멸 억제 실험

MTT반응은 수용성의 tetrazolium salt를 포함한 CCK-2 kit을 이용하여 세포의 미토콘드리아의 탈수소 효소 (dehydrogenase)에 의해서 환원되는 formazan의 양을 450 nm에서 측정하였다. 본 실험에서는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 산화 스트레스를 주어서 세포사멸을 유도한 다음 세포의 생존율을 이용하여 각각의 후보물질(hit)이 가지는 활성을 측정하였다(20).

## 결과 및 고찰

본 연구는 두 가지 목적을 가지고 실험을 수행하였다. 천식과 연관한 산화스트레스에 대하여 이를 억제할 수 있는 물질을 찾는 것이며, 또한 이러한 실험을 대량으로 하기 위해 HTS 시스템을 이용하여 보다 빠른 시간에 보다 적은 비용으로 실험을 수행하는 시스템을 구축하는데 그 목적이 있다. 먼저 비교적 간단한 DPPH와 FRAP을 이용한 항산화 실험을 HTS 시스템을 활용하여 1,000여개의 물질로부터 후보물질을 약 100여개로 줄이고자 하였다. DPPH와 FRAP 활성 실험은 매우 간단하면서도 강력한 항산화제 검색 방법으로서 많이 이용되어지고 있다.

DPPH는 화합물로서 그 자체가 매우 안정한 화합물인데 hydrogen proton radical scavenger에 의해서 색이 바뀌는 성질을 이용한 것으로 눈으로 쉽게 그 활성을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 optimal density(OD)를 측정하여 그 활성

정도를 비교할 수 있다. DPPH 항산화 활성 실험에서는 추출용매에 따라서 그 활성이 다양하게 나타났다. DW 추출물에 있어서는 오가피(*Acanthopanax senticosus*), 녹차엽 (*Camellia sinensis*), 별갑(*Amydae carapax*), 빈랑(*Arecae pericarpium*), 죽여(*Bambusae caulis Taeniam*), 골담초 (*Caragana sinica Rehder*) 등이 높게 나타났다. DMSO의 추출물에서는 측백(*Biotae orientalis Folium*), 해당근(*Chaenomelis langenariae*), 계지(*Cinnamomum cassia Blume*), 산수유 (*Cornus officinalis*), 비파엽(*Eryobotrya japonica Lindl*), 오배자(*Rhus javanica L.*) 등이 나타났다. Ethanol 추출물의 경우는 해당근, 조각자, 계혈등(*Mucunae caulis*), 육두구(*Myristica fragrans Houttuyn*), 연자육(*Nelumbo nucifera*), 적하수오 (*Polygonum multiflorum Thunb.*) 등이 높은 활성을 보여 주었다. Methanol 추출물의 경우는 선학초(*Agrimonia pilosa Ledeb*), 양강(*Alpiniae officinarum Rhizoma*), 소목(*Caesalpiniae lignum*), 해당근, 계피(*Cinnamomum loureirii Nees*), 육종용 (*Cistanche salsa Benth et Hook*) 등이 높은 활성을 나타내었다. Ethyl acetate 추출물에서는 빈랑, 소목, 강황, 오배자, 계혈등, 호장근(*Reynoutria japonica Houtt*) 등이 항산화 활성이 높게 나타났다. 한편 쥬스의 경우는 잎당귀(*Angelica gigas Nakai*), 케일(*Brassica oleracea var*), 레드치커리 (*Cichorium insybus*) 등이 활성이 높게 나타났다. 추출물질에 따라 차이를 보였으나 전체적으로 활성이 높게 나온 것으로는 해당근, 오배자, 연자육, 금앵자(*Rosae laevigatae*), 등이 있었다(Fig. 2a).

FRAP 활성실험은 물질의 환원력을 측정하는 실험으로  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ (Ferric tripyridyltriazine)이  $\text{Fe}^{\text{II}}$  - TPTZ로 되는 활성을 측정한 것이다. 실험결과 DW 추출물의 경우 꽈향 (*Teucrium veronicoides Max*), 소목, 오배자, 여정실(*Ligustrum obtusifolium*), 오약(*Lindera strychnifolia F. Villars.*), 목단피 (*Paeonia suffruticosa Andrews*) 등이 높게 나왔다. Ethanol 추출물의 경우는 소목, 해당근, 산수유 (*Cornus officinalis*), 육두구, 가자 등이 높은 활성을 보였다. Methanol 추출물의 경우는 소목, 구척(*Cibotii rhizoma*), 육종용, 산수유, 오수유 (*Evodia rutaecarpa Hooker fil.*), 오배자 등이 활성을 보였다. Ethyl acetate 추출물의 경우는 녹차엽, 빈랑(*Arecae pericarpium*), 소목, 산수유, 연교(*Forsythia koreana Nakai*), 오배자 등이 높게 나왔다. 쥬스에서는 적겨자 (*Brassica juncea*), 잎당귀, 케일, 아욱 등이 활성을 나타내었다. 또한 전체적으로 추출물질에 관계없이 활성이 높게 나온 것으로는 녹차엽, 빈랑, 소목, 흥화(*Cartami flos*), 해당근, 구척 등이었다 (Fig. 2b).

Linoleic acid 항산화 실험결과 DW 추출물에 있어서는 잣(*Pinus koraiensis*), 건포도(*Aphis gossypii Grover*), 파스타치오(*Pistachia vera*), 해바라기씨(*Crocus vernus*), 호박씨 (*Cucurbita moschata*) 등이 활성이 높게 나타났다.

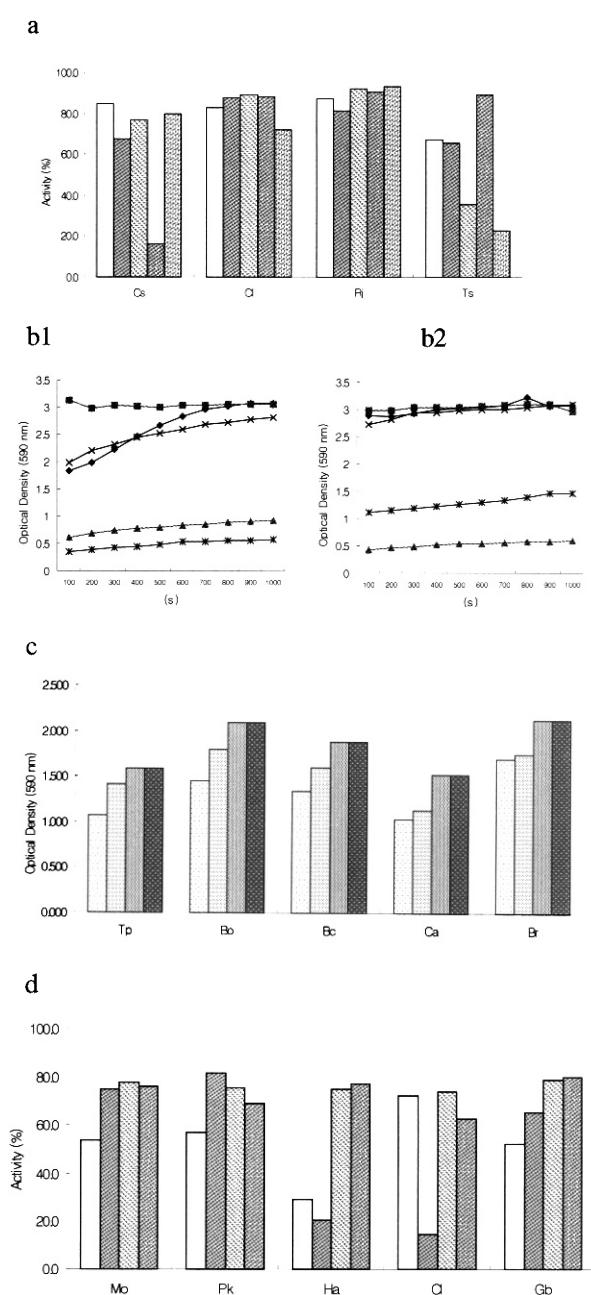


Fig. 2. Anti-oxidant activity of DW, DMSO, ethanol, methanol and ethyl acetate extraction.

a. DPPH radical scavenging activity for *Camellia sinensis* (Cs), *Chaenomelis langenariae* (Cl), *Rhus javanica L.* (Rj) and *Tsuga sieboldii* (Ts). DW (□), DMSO (■), Ethanol (▨), Methanol (■) and Ethyl acetate (▨) extraction.

b. Ferric ion reducing anti-oxidant power (FRAP) assay for *Polygonum aviculare L.* (b1) and *Salvia miltiorrhiza* Bunge (b2). DW (-◆-), DMSO (-■-), Ethanol (-▲-), Methanol (-×-) and Ethyl acetate (-\*-) extraction.

c. Hydroxyl radical scavenging for *Taraxacum platycarpum* (Tp), *Brassica oleracea L.* (Bo), *Brassica campestris* var. (Bc), *Capsicum annuum L.* (Ca), *Brassica campestris* var. narinosa (Br) after 5 (□), 10 (▨), 15 (▨), 20 (▨) hr.

d. Linoleic acid for *Melissa officinalis* (Mo), *Pinus koraiensis* (Pk), *Helianthus annuus* (Ha), *Coix lachryma-jobi* var. (Cl) and *Ginkgo biloba* (Gb). DW (□), DMSO (■), Ethanol (▨) and Methanol (■) extraction.

DMSO 추출물에 있어서는 잣(*Pinus koraiensis*), 건포도, 파스타치오, 땅콩(*Arachis hypogaea L.*) 등에서 높은 활성을 보였다. Ethanol 추출물에 있어서는 밤(*Melissa officinalis*), 파스타치오, 해바라기씨, 호박씨, 땅콩, 은행(*Ginkgo biloba*) 등이 활성을 나타내었다. Methanol 추출물에 있어서는 밤, 파스타치오, 올무(*Coix lachryma-jobi var.*), 호박씨, 은행 등이 활성을 나타내었다. 쥬스에 있어서는 케일, 쌈추(*Brassica lee ssp.*), 비타민(*Brassica campestris* var. *narinosa*) 등이 활성이 높게 나왔다 (Fig. 2c).

Hydroxyl radical 소거활성 실험은 2-deoxy-D-ribose의 산화방법을 응용한 것으로 실험결과는 다음과 같이 나왔다. DW 추출물의 경우 땅콩, 올무, 파스타치오 등이 활성이 높게 나타났다. DMSO 추출물의 경우 건포도, 밤, 잣 등이 높은 활성을 보였다. Ethanol 추출물의 경우 건포도, 밤, 해바라기씨, 잣, 파스타치오 등이 활성을 나타내었다. Methanol의 경우 밤, 해바라기씨, 잣 등이 활성을 보였으며, 쥬스의 경우 신선초(*Angelica utilis Makino*)가 활성이 높게 나타났다 (Fig. 2d).

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )는 매우 큰 확산성을 가지고 있으며, 거의 모든 부분에 존재하는 물질이다. 또한 매우 빨리 합성이 되며, 또한 빠르게 생체 내에서 여러 세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. Hydrogen peroxide는 세포막을 침투하여 세포의 신호전달과정에 이상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 hydrogen peroxide는 lipid peroxidation을 일으킬 뿐만 아니라 cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)와 prostaglandin E2 (PGE2)의 생산을 야기하게 된다. 여기서 PGE2는 protein kinase C (PKC)-mitogen activated protein kinase(MAPK) pathway를 통한 free-radical scavengers의 생산을 야기하게 된다. 이외에도 hydrogen peroxide는 스스로 신호전달자로서의 기능을 가지며, epidermal growth factor(EGF) 같은 성장호르몬에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(21-22). Hydrogen peroxide에 의한 세포사멸을 억제하는 것으로 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. DW 추출물의 경우 해바라기씨, ethyl acetate의 경우 잣, 쥬스의 경우 신선초와 시금치(*Rehmannia glutinosa Libo*)에서 그 활성이 높게 나타났다 (Fig. 3).

호흡기 질환에 있어 산화스트레스와 폐의 염증현상은 정도의 차이는 있지만 거의 비슷한 패턴으로 일어난다고 보여진다(10). 이러한 관점에서 본 연구는 농산물에서 산화스트레스는 일어나게 하는 유발 물질로 알려진 superoxide를 억제하는 식품소재를 HTS 시스템을 이용하여 알아보고자 하였다. 또한 위의 실험에서 나온 몇 가지 물질을 이용하여 동물 실험모델(ovalbumin-induced model)을 만들어 실제 *in vivo*에서 control에 비교하여 어느 정도 효과가 있는지를 실험 중에 있다.

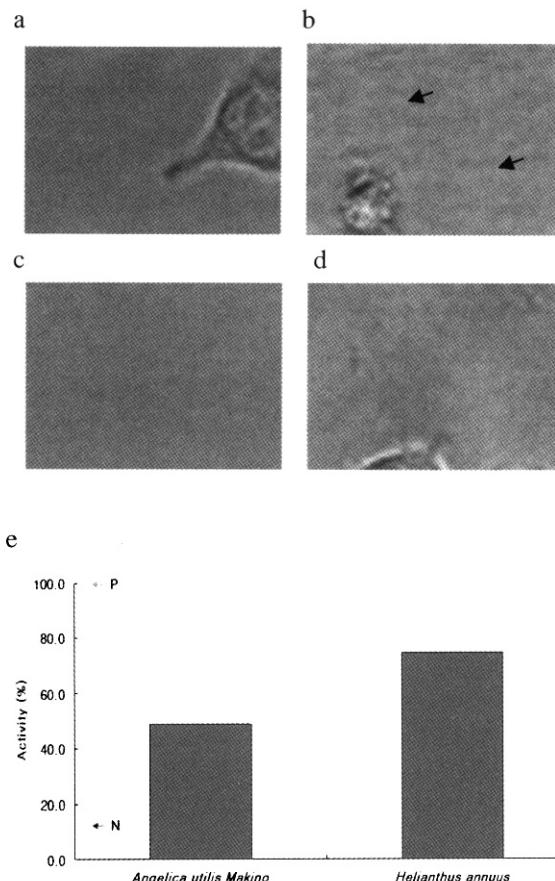


Fig. 3. MTT assay for protection effect by hydrogen peroxide.

- a.No treated.
- b.Treated 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  (membrane breakdown: arrow).
- c.Treated 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  with *Angelica Utilis* extraction.
- d.Treated 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  with *Helianthus annuus* extraction.
- e.Diagram of MTT assay for protection effect by hydrogen peroxide (P; positive control, N; negative control).

## 요 약

천식과 관련하여 산화스트레스 (Oxidant stress)는 그 발병요인 중의 하나로 알려져 있다. 이에 본 연구는 농산물과 한약재를 이용하여 항산화 물질을 찾고자 하였으며, 시간과 비용의 단축을 위하여 HTS(high throughput screening)을 이용을 하였다. 항산화 실험과 관련하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), FRAP(ferric ion reducing antioxidant power), HO(hydroxyl radical) 소거, linoleic acid에 대한 항산화 활성을 시행하였다. 이후  $H_2O_2$ 에 의한 산화스트레스를 이용한 세포사멸을 유도하여 세포생존을 확인해 보았다. 실험결과 해바라기씨(*Helianthus annuus*), 신선초(*Angelica utilis Makino*), 시금치(*Rehmannia glutinosa Libo*) 등이 활성이 높게 나타났다. 본 연구는 여기에서 나온 hit를 이용하여 동물모델 실험을 진행하고자 한다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

## 참고문헌

1. Keseru, GM. (2004) The role of high throughput screening in the early stage of drug research. *Acta. Pharm. Hung.*, 74, 5-10
2. Winkler, DA. (2004) Neural networks as robust tools in drug lead discovery and development. *Mol. Biotechnol.*, 27, 139-168
3. Berg, M., Undisz, K., Thiericke, R., Moore, T. and Posten, C. (2000) Miniaturization of a functional transcription assay in yeast (human progesterone receptor) in the 384- and 1536-well plate format. *J. Biomol. Screen.*, 5, 71-76
4. Berg, M., Undisz, K., Thiericke, R., Zimmermann, P., Moore, T. and Posten, C. (2001) Evaluation of liquid handling conditions in microplates. *J. Biomol. Screen.*, 6, 47-56
5. Peden, DB. (2005) The epidemiology and genetics of asthma risk associated with air pollution. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 115, 213-219
6. Rabinovitch, N., Zhang, L., Murphy, JR., Vedal, S., Dutton, SJ. and Gelfand, EW. (2004) Effects of wintertime ambient air pollutants on asthma exacerbations in urban minority children with moderate to severe disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 114, 1131-1137
7. Osur, SL. (2002) Viral respiratory infections in association with asthma and sinusitis: a review. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.*, 89, 553-560
8. Lee, I., Salomon, AR., Ficarro, S., Mathes, I., Lottspeich, F., Grossman, LI. and Hutmenn, M. (2005) cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J. Biol. Chem.*, 280, 6094-6100
9. Nadeem, A., Chhabra, SK., Masood, A. and Raj, HG. (2003) Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 111, 72-78.
10. McNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 429, 195-207.
11. Varshavskii, BIa., Trubnikov, GV., Galaktipmpva, LP., Koreniak, NA., Koledeznaiia, IL. and Oberemok, AN. (2003) Oxidant-antioxidant status of patients with bronchial asthma during inhalation and systemic glucocorticoid therapy. *Ter. Arkh.*, 75, 21-24
12. Kinnula, VL. and Crapo, JD. (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 167, 1600-1619
13. Kitts, DD. and Weiler, K. (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm.*, 9, 1309-1323
14. Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Wagner, KH. and Elmada, I. (2004) Tocopherol composition of deodorization distillates and their antioxidative activity. *Nahrung.*, 48, 34-37
15. Huang, HY., Chang, CK., Tso, TK., Huang, JJ., Chang, WW. and Tsai, YC. (2004) Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, 55, 423-429
16. Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. and Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free. Radic. Res.*, 36, 177-187
17. Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 3396-3402
18. Okada, Y., Okajima, H., Shima, Y. and Ohta, H. (2002) Hydroxyl radical scavenging action of capsaicin. *Redox. Rep.*, 7, 153-157
19. Mun'im, A., Negishi, O. and Ozawa, T. (2003) Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 410-414
20. Liu, SQ., Saijo, K., Todoroki, T. and Ohno, T. (1995) Induction of human autologous cytotoxic T lymphocytes on formalin-fixed and paraffin-embedded tumour sections. *Nat. Med.*, 1, 267-271
21. Bae, YS., Kang, SW., Seo, MS., Baines, IC., Tekle, E., Chock, PB. and Rhee, SG. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 272, 217-221
22. Han, HJ., Lee, YJ., Park, JY., Kim, EJ., Lee, JH. and Taub, ML. (2005) Effect of EGF on hydrogen peroxidase-induced inhibition of alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells: involvement of MAPK and AA release. *J. Cell. Physiol.*, 20, 217-225