Journal of Radiation Industry 8(1) : 35~42(2014)

방사선 돌연변이 블랙베리 주성분 Cyanidin-3-glucoside의 과산화수소 유발 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과

조병옥 · 소양강 · 이창욱 · 진창현 · 육홍선[1] · 정일윤*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소, [1]충남대학교 식품영양학과

Protective Effect of Cyanidin-3-glucoside, the Major Component of *Rubus fruticosus* L. Mutants by Irradiation, on H_2O_2-induced Oxidative Damage in HepG2 Cells

Byoung Ok Cho, Yangkang So, Chang Wook Lee, Chang Hyun Jin, Hong Sun Yook[1] and Il Yun Jeong*

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

[1]*Department of Food Science and Human Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

Abstract - This study was conducted to analyze the protective capacity of cyanidin-3-glucoside (C3G), which is rich in mulberry and blackberry as an anthocyanin pigment. In this study, we found that treatment with C3G significantly reduced ROS production in hydrogen peroxide (H_2O_2)-treated HepG2 cells in a dose-dependent manner. In addition, treatment with C3G significantly increased the cell viability in a dose-dependent manner in H_2O_2-treated HepG2 cells. Moreover, treatment with C3G dose-dependently decreased the release of LDH and activation of caspase-3 in HepG2 cells treated with H_2O_2. Furthermore, the DNA damage in H_2O_2-treated HepG2 cells was decreased by C3G treatment when compared with the control group in a dose-dependent manner. Additionally, treatment with C3G recovered the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase in H_2O_2-treated HepG2 cells. To summarize, these results suggest that C3G protects cells from H_2O_2-induced oxidative damage by activating antioxidant enzymes.

Key words : Cyanidin-3-glucoside, Hydrogen peroxide, ROS, DNA damage, Antioxidant enzyme

서 론

Reactive oxygen species (ROS)란 높은 산화력을 갖는 산소종으로서 superoxide anioin radical ($O2\cdot^-$), hydroxyl radical (^-OH)과 같은 산소 중심의 라디칼뿐만 아니라 hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (O_2)와 같은 비라디칼 종이 존재하며, 이들이 생체 성분과 반응하여 생성된 peroxyl radical ($ROO\cdot$), alkoxyl radical ($RO\cdot$) 등이 포함된다 (Rhie *et al*. 2001; Han *et al*. 2013). 이러한 ROS의 생체 내 증가는 DNA나 단백질 그리고 지질 등 bio-

* Corresponding author: Il Yun Jeong, Tel. +82-63-570-3150, Fax. +82-63-570-3159, E-mail. iyjeong@kaeri.re.kr

molecules에 독성효과를 일으켜 세포 내에 산화적 스트레스의 축적을 일으킬 수 있으며 산화환원 반응성 대사 및 신호전달계와 병리학적 상태의 조절을 방해한다 (Kwon and Sheen 2008). 또한 이러한 ROS의 축적은 당뇨, 간경변, 암 및 심혈관질환 등을 비롯한 다양한 질병들에 영향을 미친다 (Sathuvan *et al*. 2012). 이러한 ROS로부터 우리의 몸을 보호하기 위해서는 폴리페놀, 비타민 C, 비타민 E와 같은 항산화물질과 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidease (GPx), glutathione reductase (GR)과 같은 항산화 효소 활성에 의해 항산화 네트워크가 작동이 되어야 한다. 하지만 ROS가 과다하게 생성되면 생체 내의 항산화 네트워크가 균형을 잃게 되어 신체 구성물질이 산화되기 시작한다. 불균형된 항산화 네트워크를 회복하기 위해서는 항산화 효과가 뛰어난 물질들을 섭취해야 한다. 최근, 이러한 항산화 효과가 뛰어난 물질들에 대한 연구가 식물유래 천연 항산화제 분야에서 널리 이루어지고 있다 (Choi *et al*. 2012).

정상적인 항산화 네트워크를 유지하는 데 크게 기여하는 물질들은 플라보노이드, 탄닌, 페놀, 안토시아닌 등이 있다. 특히 안토시아닌 색소인 cyanidin-3-glucoside (C3G)의 경우 나무딸기 속 식물인 블랙베리 (*Rubus fruticosus*), 복분자 (*R. coreanus*), 멍석딸기 (*R. parvifolius*) 등에 다량으로 함유되어 있다. C3G는 cyanidine의 3번 탄소에 glucose가 결합되어 있는 플라보노이드 계열의 화합물로써 항암작용 및 B형 바이러스 증식 억제, 망막장애의 치료, 시력개선 효과, 항산화 작용 등 생리활성에도 효능을 나타내는 것으로 최근에 보고됨으로써 기능성 소재로서 각광받고 있다 (Shin *et al*. 2008; Kim *et al*. 2012). 최근에 본 연구진은 방사선 돌연변이 품종인 블랙베리 메이플에서 10개의 안토시아닌 성분을 확인하였고, 그 중 C3G가 주성분임을 확인하였다 (Cho *et al*. 2011). 비록 C3G의 항산화 및 세포보호 효능에 대해 기존에 많은 연구들이 보고되었지만 (Min *et al*. 2011; Sun *et al*. 2012; Zhu *et al*. 2012; Harsha *et al*. 2013), C3G를 이용하여 간 기능 개선 효과에 대한 연구결과는 미비한 실정이다. 따라서 이를 적극 활용하기 위해서는 C3G를 이용하여 간 세포 보호 효과에 관련된 연구들이 필요하다.

그러므로 본 연구에서는 방사선 돌연변이 블랙베리의 주성분이며 안토시아닌 색소인 C3G를 이용하여 산화적 스트레스를 유발하는 H_2O_2를 처리한 인간 간암 세포주 HepG2에 대한 C3G의 세포보호 능력과 항산화 효소 활성을 검증함으로써 간 기능 개선 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 cyanidin-3-glucoside와 H_2O_2는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여, 멸균된 3차 증류수에 녹여 사용하였다. 1차 antibody (cleaved caspase-3, β-actin)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 2차 antibody anti-rabbit IgG HRP-conjugated antibody와 5-(and-6)-carboxy-2′7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H_2DCFDA)는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

본 실험에서 사용한 인체 간암세포주 HepG2는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양받아 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA)와 100 units ml^{-1} penicillin, 100 μg ml^{-1} streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지 (Hyclone)를 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

3. ROS 측정

세포내 ROS 측정은 carboxy-H_2DCFDA를 사용하여 측정하였다. 먼저, HepG2 세포를 최종농도 2×10^5 cells ml^{-1}가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 다음, C3G를 10, 20, 30 μM의 농도로 전처리하고 1시간 후에 H_2O_2 2 mM을 첨가하여 30분 동안 배양하였다. 그런 다음, 10 μM의 carboxy-H_2DCFDA를 첨가하여 30분 동안 배양한 후 well에서 세포를 회수하여 PBS로 2회 세척하고 유세포분석기 (Cytomics FC500, Beckman, Miami, FL, USA)를 이용하여 ROS를 측정하였다.

4. 세포독성측정

세포독성은 EZ-Cytox cell viability assay kit (DAEIL lab, Seoul, Korea)를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. HepG2 세포를 최종농도 2×10^5 cells ml^{-1}가 되도록 96 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 다음, C3G를 10, 20, 30 μM의 농도로 전처리하고 1시간 후에 H_2O_2 2 mM을 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 24시간이 지난 후 EZ-Cytox 시약 10 μl를 넣고 4시간 동안 배양한

후 microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다.

5. Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

LDH 활성은 lactate dehydrogenase activity assay kit (BioVision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. HepG2 세포를 최종농도 2×10^5 cells ml^{-1}가 되도록 96 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 다음, C3G를 10, 20, 30 μM의 농도로 전처리하고 1시간 후에 H_2O_2 2 mM을 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 24시간이 지난 후 96 well plate에 배양액 5 μL와 assay buffer 45 μL를 섞은 다음, substrate가 포함된 reaction mixture 50 μL를 넣고 잘 혼합한 후 microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Western blot을 이용한 caspase-3 단백질 분석

HepG2 세포를 최종농도 2×10^5 cells ml^{-1}가 되도록 희석하여 100 mm dish에 분주한 후, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 다음, C3G를 10, 20, 30 μM의 농도로 전처리하고 1시간 후에 H_2O_2 2 mM을 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 dish에서 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 1 mM PMSF와 proteinase inhibitor를 첨가한 NP40 cell lysis buffer (Sigma-Aldrich)를 첨가하여 얼음에서 30분간 세포를 용해한 후, 4°C, 12,000 rpm으로 15분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 그 상층액의 단백질 농도를 정량한 다음, 상층액에 sample buffer를 섞어 5분간 끓인 후, SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 그런 다음 membrane을 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking하고 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 하루 밤 동안 반응시킨 다음, TBS-T buffer로 10분간 3번 세척하고 2차 antibody를 처리하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBS-T buffer로 10분간 3번 세척하고 enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia, Bucks, UK)를 사용하여 caspase-3 단백질의 발현을 분석하였다.

7. Comet assay

HepG2 세포를 최종농도 2×10^5 cells ml^{-1}가 되도록 희석하여 100 mm dish에 분주한 후, 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 다음, C3G를 10, 20, 30 μM의 농도로 전처리하고 1시간 후에 H_2O_2 2 mM을 처리하여 15분 동안 배양하였다. 배양 후 dish에서 세포를 회수하여 PBS로 세척하였으며, comet assay는 Cho *et al.* (2013)에 의해 보고된 방법에 따라 실험하였다. 준비된 세포와 0.8%의 low melting agarose (LMA)와 섞은 후, 0.5% normal melting-point agarose (NMA)가 precoating된 microscope slide 위에 골고루 분산되게 분주한 후, 즉시 cover glass로 덮어 얼음위에서 gel을 굳힌 다음 cover glass를 제거하였다. 여기에 0.8% LMA를 한겹 더 분주한 후 cover glass를 덮어 다시 굳혔다. Gel이 굳은 후 cover glass를 제거하고 cold TAE lysis buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% SDS)에 담가 4°C에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 세포 용해가 끝난 후, slide를 electrophoresis tank에 올려놓고 TAE buffer를 채워 4 V, 21 mA에서 25분 동안 전기영동을 시행하였다. 이상의 모든 과정은 빛에 의한 추가적인 DNA 손상을 막기 위해 어두운 조명상태에서 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 slide를 증류수에서 세척하고 실온에서 건조하였다. 이후 slide를 10 μg ml^{-1}의 propidium iodide에 담가 10분 동안 염색한 후 증류수로 조심히 세척하여 CCD 카메라가 부착된 형광현미경 (Leica DM2500, Wetzlar, Germany)을 사용하여 관찰하였으며, 세포의 DNA 손상정도는 Komet 5.5 이미지분석 프로그램 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK)을 통해 각 시료마다 준비된 2개의 slide에서 50개의 세포를 무작위로 선택하여 측정하였다.

8. 항산화 효소 활성 측정

SOD와 CAT 효소 활성은 superoxide dismutase, catalase assay kit를 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다.

9. 통계분석

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 student's *t*-test를 이용하여, $p<0.05$일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 논의

1. 세포내 ROS 소거 효과

먼저 C3G의 세포 내 ROS 소거 효능을 조사하기 위하여 carboxy-H_2DCFDA를 사용하여 유세포 분석기에서

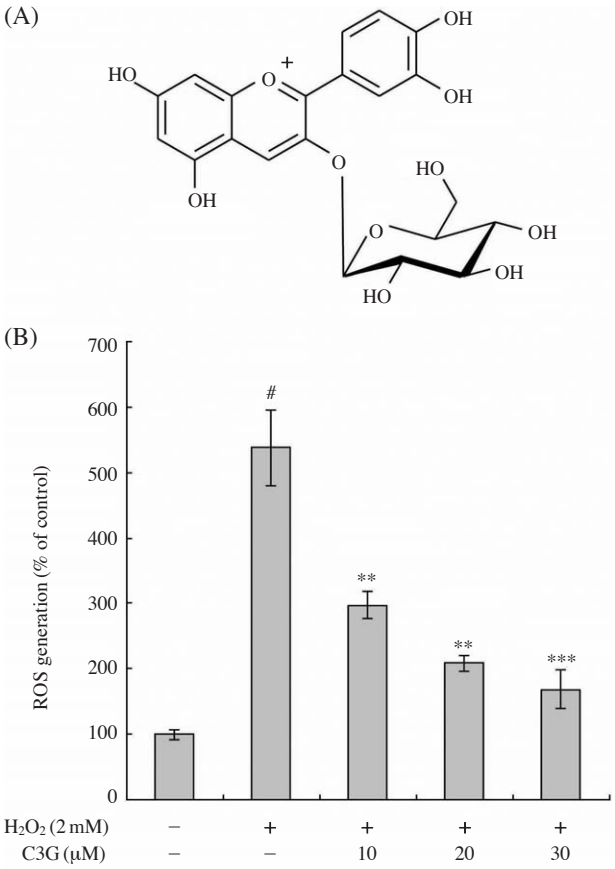

Fig. 1. Effect of C3G pretreatment on the generation of intracellular ROS in HepG2 cells treated with H_2O_2. (A) Chemical structure of C3G. (B) Cells were pretreated with or without C3G (10, 20, and 30 μM) for 1 h, followed by 2 mM H_2O_2 treatment for 15 min. Error bars represent the mean ± SD. Significant differences were compared with the control at $^{\#}p < 0.001$ and the H_2O_2 alone at $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ using the Student's *t*-test.

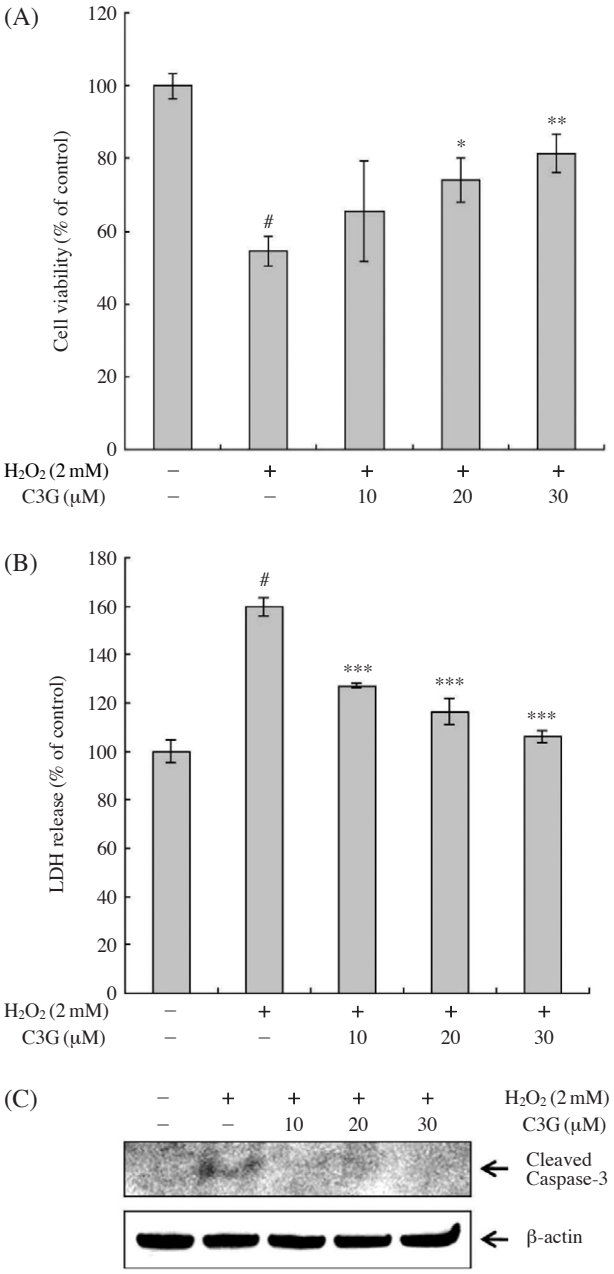

Fig. 2. Effect of C3G pretreatment on H_2O_2-induced cell cytotoxicity in HepG2 cells. (A) Cell viability. (B) LDH release. (C) Caspase-3 activation. Cells were pretreated with or without C3G (10, 20, and 30 μM) for 1 h, followed by 2 mM H_2O_2 treatment for 24 h. Error bars represent the mean ± SD. Significant differences were compared with the control at $^{\#}p < 0.001$ and the H_2O_2 alone at $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ using the Student's *t*-test.

측정하였다. HepG2 세포에 2 mM의 H_2O_2를 처리하였을 때 생성된 ROS의 수준이 대조군과 비교하여 약 538%를 나타내었지만, C3G를 전처리한 경우 H_2O_2 처리군과 비교하여 농도 의존적 (10 μM에서 297%, 20 μM에서 209%, 30 μM에서 168%)으로 그 수준이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 1B). 안토시아닌에 속하며 과일과 야채에 많이 존재하는 C3G는 in vitro 항산화 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 이전의 연구에 의하면 C3G가 풍부한 베리 추출물은 in vitro 항산화 효능이 높은 것으로 보고하였다 (Sun *et al*. 2012; Harsha *et al*. 2013). 또한 Min *et al*. (2011)에 의하면 ischemia를 유발한 마우스에서 C3G가 superoxide를 감소시킴으로서 신경세포를 보호한다고 보고하였다. 따라서, H_2O_2를 처리로 인해 발생하는 산화스트레스 증가를 C3G가 감소시킴으로서 뛰어난 항산화 효능을 나타내는 것으로 판단된다.

2. 산화적 스트레스에 의한 세포 독성 보호 효과

본 연구에서는 C3G의 간세포 보호 효과를 알아보기 위하여 HepG2 세포에 H_2O_2를 처리하여 산화적 손상을 일으킨 후 산화적 손상에 대한 세포독성을 수용성 tetra-

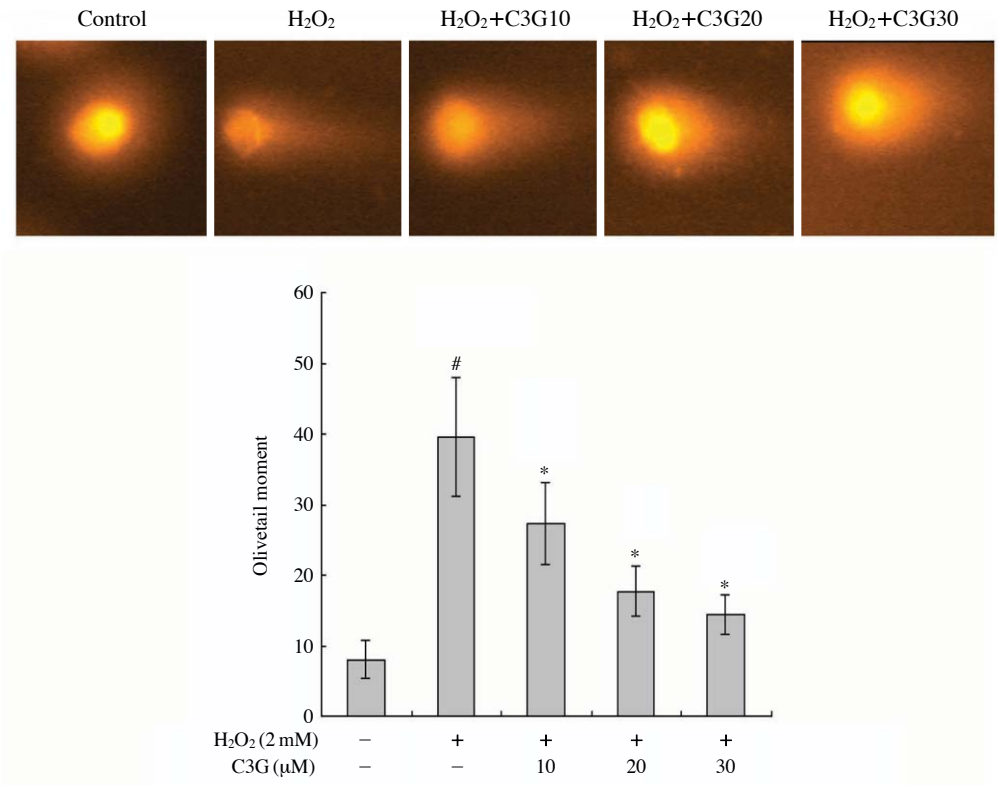

Fig. 3. Effect of C3G pretreatment on the DNA damage in H_2O_2-treated HepG2 cells. Representative images and the percentage of DNA damage in H_2O_2-treated HepG2 cells detected by the comet assay. Cells were pretreated with or without C3G (10, 20, and 30 μM) for 1 h, followed by 2 mM H_2O_2 treatment for 15 min. Error bars represent the mean±SD. Significant differences were compared with the control at $^{\#}p<0.001$ and the H_2O_2 alone at $^{*}p<0.001$ using the Student's *t*-test.

zolium salt의 하나인 WST-1을 사용하여 WST-1의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. HepG2 세포에 2 mM의 H_2O_2를 처리하였을 때 세포 생존율이 대조군과 비교하여 약 53.7%를 나타내었지만, C3G를 전처리한 경우 H_2O_2 처리군과 비교하여 농도 의존적(10 μM에서 64.3%, 20 μM에서 72.7%, 30 μM에서 80.1%)으로 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 최근 연구에 의하면 high glucose 처리된 HepG2 세포에서 C3G가 과도한 ROS 생성을 억제함과 동시에 세포 생존율을 증가시킨다고 보고하였다(Zhu *et al*. 2012). WST-1 assay에 더불어 C3G의 간세포 보호 효과는 LDH assay에 의하여 확인되었다. LDH는 세포에 존재하는 산화환원효소이며 산화적 세포 손상 시 세포 밖으로 방출되어지며, 세포 독성 지표로 널리 사용되는 효소이다. Fig. 2B에 나타낸 바와 같이 HepG2 세포에 2 mM의 H_2O_2를 처리하였을 때 LDH 방출율이 대조군과 비교하여 약 59.7% 증가하였지만, C3G를 전처리한 경우 H_2O_2 처리군과 비교하여 10 μM에서 27.2%, 20 μM에서 16.5%, 30 μM에서 6.3%로 LDH 방출율이 감소하는 것을 확인하였다. Hwang *et al*. (2011)에 따르면 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) 처리된 HepG2 세포에서 자색고구마의 안토시아닌은 LDH 방출 억제 및 세포 생존율을 증가하여 세포 보호 효능을 나타낸다고 보고하였고, Im *et al*. (2013) 또한 복분자 딸기 안토시아닌이 ROS 생성과 LDH 방출 억제 및 세포 생존율을 증가하여 H_2O_2에 의한 산화적 손상으로부터 신경세포 보호 효능을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Song *et al*. (2013)은 C3G가 acrylamide에 의해 유발된 산화스트레스로부터 세포 보호 효능을 나타낸다고 보고하였다. 이를 토대로 보았을 때 C3G는 뛰어난 세포 보호 효능을 보이는 것으로 사료된다. 과도한 ROS는 산화적 스트레스를 유발하며, 세포 기능 및 구성 성분의 손상을 일으키며, 결국 세포 사멸(apoptosis)을 유도한다. 세포 사멸 기전에서 caspase pathway의 활성화는 매우 중요한 역할을 하며, effector caspase인 caspase-3를 활성화는 세포의 증식과 생존에 중요한 역할을 하는 PARP를 절단하거나 또는 직접적으로 핵의 응축과 DNA 절단에 영향을 주어 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(Cho *et al*. 2012). Fig. 2C에 나타낸 바와 같이 HepG2 세포에 H_2O_2를 처리

하였을 때 caspase-3의 발현양이 증가하였지만, C3G를 전처리한 경우 caspase-3의 발현양이 감소하는 것을 확인하였으며, 본 연구결과는 Tanaka *et al.* (2013)과 Ke *et al.* (2011)의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 C3G가 산화적 스트레스 상황에서 뛰어난 보호 효과를 나타낸다고 판단되어진다.

3. 산화적 DNA 손상 보호 효과

Comet assay를 이용한 C3G의 H_2O_2로 유발된 산화적 DNA 손상 억제 효과 실험 결과는 Fig. 3에 나타내었다. HepG2 세포에 2 mM의 H_2O_2를 처리하여 DNA 손상을 유도한 결과 DNA 손상지표인 tail length와 olive tail moment가 대조군과 비교하여 크게 증가하였다. 그러나 C3G를 10 μM, 20 μM, 30 μM의 농도로 전처리한 경우 H_2O_2 처리군과 비교하여 DNA 손상 정도가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Russo *et al.* (2005)의 보고에 의한 세포 실험에서 나타난 C3G의 DNA 손상 억제 효과와 일치하는 결과이며, C3G가 산화적 스트레스 유발 물질인 H_2O_2에 의해 유도되는 DNA 손상을 효과적으로 억제한다는 것을 알 수 있었다.

4. 항산화 효소 활성에 대한 효과

기존 연구에 의하면 안토시아닌이 풍부한 블랙베리 추출물이 Keratinocytes에서 CAT, GPx, MnSOD 같은 항산화 효소의 발현을 증가시킴으로서 UV에 의해 유도된 산화 손상을 억제한다고 보고하였다(Murapa *et al.* 2012). 또한 Li *et al.* (2008)은 랫트를 이용한 동물실험에서 에탄올에 의한 위손상 유도 모델에서 나타나는 산화스트레스에 C3G가 SOD, CAT, GPx 같은 항산화 효소의 활성을 회복시켜 위손상을 억제하고 위 보호 효과를 나타낸다고 보고하였다. H_2O_2로 유발된 산화적 스트레스에 대한 C3G의 세포 보호 기전을 확인하기 위하여 SOD와 CAT 항산화 효소의 활성을 조사하여 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. HepG2 세포에 2 mM의 H_2O_2를 처리하였을 때 SOD와 CAT의 효소 활성이 대조군과 비교하여 각각 약 82.8%, 84.2%까지 감소하였다. 하지만 C3G를 전처리한 경우 SOD 효소 활성이 H_2O_2 처리군과 비교하여 10 μM에서 96.3%, 20 μM에서 98.7%, 30 μM에서 100.7%까지 유의적으로 회복하는 것을 확인하였으며, CAT 효소 활성 또한 10 μM에서 92.3%, 20 μM에서 96.3%, 30 μM에서 99%까지 유의적으로 회복하는 것을 확인하였다. 이는 C3G 처리에 의한 HepG2 세포의 보호 효능에 항산화 효소의 활성화가 관여함을 시사하고 있다.

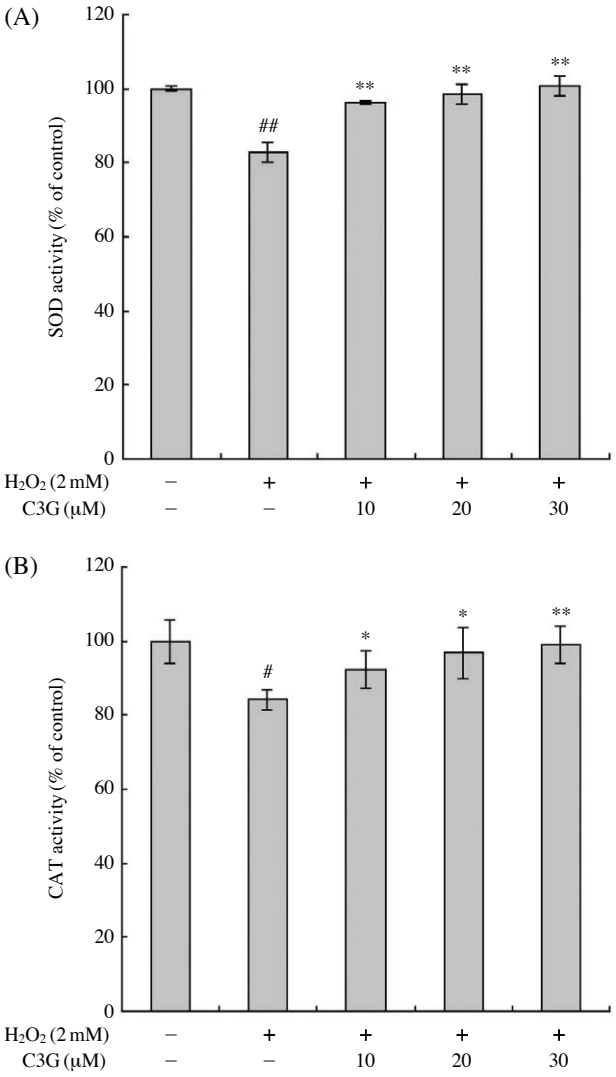

Fig. 4. Effect of C3G pretreatment on the SOD (A) and CAT (B) activity in H_2O_2-treated HepG2 cells. Cells were pretreated with or without C3G (10, 20, and 30 μM) for 1 h, followed by 2 mM H_2O_2 treatment for 24 h. Error bars represent the mean±SD. Significant differences were compared with the control at $^{\#}p<0.01$, $^{\#\#}p<0.001$ and the H_2O_2 alone at $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ using the Student's *t*-test.

결 론

본 연구에서는 인간 간암세포주 HepG2에서 H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스에 미치는 C3G의 세포보호 효능에 대하여 알아보고자 하였다. C3G 처리 시 H_2O_2로 처리된 HepG2 세포에서 농도 의존적으로 ROS의 생산을 억제하였으며, 또한 세포 생존율을 증가시키고 LDH의 방출 및 caspase-3의 활성을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다. 나아가, comet assay를 통해 DNA 손상 정도를 분석한 결과, H_2O_2로 인한 산화적 스트레스에

의한 DNA 손상을 C3G의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소시켰다. 또한 C3G 처리 시 H_2O_2 처리에 의해 감소한 SOD와 CAT의 효소 활성이 농도가 증가함에 따라 유의적으로 회복하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 볼 때 C3G는 항산화 효소 활성을 회복시킴으로서 H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스로부터 HepG2 간세포를 보호하는 것으로 판단되며, C3G가 간 손상 보호 및 간 기능 개선 효과를 갖는 기능성 소재로 활용되어 질 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 미래창조과학부 지원 방사선기술개발사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Cho BO, Ryu HW, Jin CH, Choi DS, Kang SY, Kim DS, Byun MW and Jeong IY. 2011. Blackberry extract attenuates oxidative stress through up-regulation of Nrf2-dependent antioxidant enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *J. Agric. Food Chem.* **59**:11442-11448.

Cho BO, Ryu HW, So Y, Jin CH, Baek JY, Park KH, Byun EH and Jeong IY. 2013. Hepatoprotective effect of 2,3-dehydrosilybin on carbon tetrachloride-induced liver injury in Rats. *Food Chem.* **138**:107-115.

Cho BO, Ryu HW, So YK, Jin CH, Byun MW, Kim WG and Jeong IY. 2012. *Ishige sinicola* extracts induce apoptosis via activation of a caspase cascade in human HeLa cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**:901-906.

Choi CH, Won DH, Hwang JP and Park SN. 2012. Antioxidative effect of extracts from different parts of *Juncus effusus* L. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **38**:274-282.

Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, HKim HS, Jeon SH, Hwang JP and Park SN. 2013. Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **39**:1-8.

Harsha PSCS, Khan MI, Prabhakar P and Giridhar P. 2013. Cyanidin-3-glucoside, nutritionally important constituents and *in vitro* antioxidant activities of *Santalum album* L. berries. *Food Res. Int.* **50**:275-281.

Hwang YP, Choi JH, Choi JM, Chung YC and Jeong HG. 2011. Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against *tert*-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **49**:2081-2089.

Im SE, Nam TG, Lee H, Han MW, Heo HJ, Koo SI, Lee CY and Kim DO. 2013. Anthocyanins in the ripe fruits of *Rubus coreanus* Miquel and their protective effect on neuronal PC-12 cells. *Food Chem.* **139**:604-610.

Ke Z, Liu Y, Wang X, Fan Z, Chen G, Xu M, Bower KA, Frank JA, Ou X, Shi X and Luo J. 2011. Cyanidin-3-glucoside ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing brain. *J. Neurosci. Res.* **89**:1676-1684.

Kim HB, Kim JB, Seok YS, Seo SD, Kim SL and Sung GB. 2012. The effect of citric acid and enzyme inactivation treatment on C3G stability and antioxidant capacity of mulberry fruit jam. *J. Seric. Entomol. Sci.* **50**:82-86.

Kwon KJ and Sheen YY. 2008. Effect of Vitamin C and GSH on the Hg Induced ROS. *J. Environ. Toxicol.* **23**:33-39.

Li CY, Xu HD, Zhao BT, Chang HI and Rhee HI. 2008. Gastroprotective effect of cyanidin 3-glucoside on ethanol-induced gastric lesions in rats. *Alcohol* **42**:683-687.

Min J, Yu SW, Baek SH, Nair KM, Bae ON, Bhatt A, Kassab M, Nair MG and Majid A. 2011. Neuroprotective effect of cyanidin-3-*O*-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* **500**:157-161.

Murapa P, Dai J, Chung M, Mumper RJ and D'Orazio J. 2012. Anthocyanin-rich fractions of blackberry extracts reduce UV-induced free radicals and oxidative damage in keratinocytes. *Phytother. Res.* **26**:106-112.

Rhie GE, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC and Chung JH. 2001. Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **117**:1212-1217.

Russo A, Fauci LL, Acquaviva R, Campisi A, Raciti G, Scifo C, Renis M, Galvano G, Vanella A and Galvano F. 2005. Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: protective effect of cyanidin 3-*O*-β-D-glucoside. *J. Nutr. Biochem.* **16**:31-37.

Sathuvan M, Vignesh A, Thangam R, Palani P, Rengasamy R and Murugesan K. 2012. In Vitro Antioxidant and Anticancer potential of Bark of *Costus pictus* D. DON. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**:S741-S749.

Shin JS, Lee JC, Sim OK, Yoon TY, Cho HJ and Kim EY. 2008. Plant regeneration via multiple shoot formation from sucker explant of hybrid blackberry (*Rubus fruticousus* L. x *R. parvifolius* L.). *Korean J. Plant Res.* **21**:111-116.

Song J, Zhao M, Liu X, Zhu Y, Hu X and Chen F. 2013. Protection of cyanidin-3-glucoside against oxidative stress induced by acrylamide in human MDA-MB-231 cells. *Food Chem. Toxicol.* **58**:306-310.

Sun CD, Zhang B, Zhang JK, Xu CJ, Wu YL, Li X and Chen KS. 2012. Cyanidin-3-glucoside-rich extract from Chinese bayberry fruit protects pancreatic β cells and ameliorates

hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Med. Food* **15**:288-298.

Tanaka J, Nakanishi T, Shimoda H, Nakamura S, Tsuruma K, Shimazawa M, Matsuda H, Yoshikawa M and Hara H. 2013. Purple rice extract and its constituents suppress endoplasmic reticulum stress-induced retinal damage in vitro and in vivo. *Life Sci*. **92**:17-25.

Zhu W, Jia Q, Wang Y, Zhang Y and Xia M. 2012. The anthocyanins cyanidin-3-*O*-β-glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway. *Free Radic. Biol. Med*. **52**:314-327.

Manuscript Received: May 2, 2014
Revised: May 19, 2014
Revision Accepted: May 29, 2014