

β-Carotene과 Lycopene의 양자역학 및 화학적 항산화능과 세포 내 산화적 스트레스 보호 효과의 비교

— 연구노트 —

박선영¹ · 정하나² · 진창호³ · 황금택¹ · 곽호경²

¹서울대학교 생활과학대학 식품영양학과·생활과학연구소

²한국방송통신대학교 생활과학과

³한국과학기술연구원 강릉분원 천연물연구소 SFS융합연구단

Comparison of Quantitative Structure-Activity Relationship and Chemical Antioxidant Activity of β-Carotene and Lycopene and Their Protective Effects on Intracellular Oxidative Stress

Sun Young Park¹, Hana Jung², Changho Jhin³, Keum Taek Hwang¹, and Ho-Kyung Kwak²

¹Department of Food and Nutrition, and Research Institute of Human Ecology, Seoul National University

²Department of Human Ecology, Korea National Open University

³Convergence Research Center for Smart Farm Solution, Korea Institute of Science and
Technology (KIST) Gangneung Institute

ABSTRACT The aim of this study was to determine the chemical and intracellular antioxidant activities of β-carotene and lycopene and to compare their quantitative structure-activity relationship (QSAR). In our previous study, the second ionization energy of lycopene was higher than that of β-carotene, as calculated by QSAR. Chemical antioxidant activities of β-carotene, lycopene, and Trolox were examined by measuring ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. Intracellular antioxidant activities were evaluated by intracellular reactive oxygen species (ROS) and DNA fragmentation. The FRAP of lycopene was higher than that of β-carotene ($P<0.05$), and the two carotenoids had similar antioxidant activities in DPPH radical scavenging activity assay. Trolox had the greatest chemical antioxidant activities ($P<0.05$). When RAW264.7 cells were treated with lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/mL) for 20 h, intracellular ROS and DNA fragmentation significantly increased ($P<0.05$). RAW 264.7 cells pretreated with β-carotene (4 μM) and lycopene (0.4~2 μM) for 4 h formed significantly less intracellular ROS than LPS-treated control cells ($P<0.05$), whereas cells with Trolox did not reduce production of intracellular ROS. In addition, cells pretreated with 2 μM lycopene produced less intracellular ROS than those treated with β-carotene ($P<0.05$). DNA fragmentation of cells with β-carotene and lycopene was similar to that of LPS-treated control cells as measured by Hoechst staining. The antioxidant ability of lycopene was greater than that of β-carotene in the QSAR, FRAP, and intracellular ROS assays ($P<0.05$). β-Carotene and lycopene had lower antioxidant activities as measured by FRAP ($P<0.05$) but higher intracellular protective effects against LPS-induced oxidative stress in comparison with Trolox.

Key words: β-carotene, lycopene, antioxidant activity, lipopolysaccharide, reactive oxygen species

서 론

염증반응은 외상과 세균침입 등에 대한 생체반응으로 체내의 면역세포가 외부물질에 반응하여 염증전달물질을 분비하면서 일어난다(1). 대식세포는 염증반응에 관여하는 주요 세포로서 면역세포들이 분비한 면역물질이나 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 활성화되어 염증 관련 사이토카인

(cytokine), nitric oxide, prostaglandin E₂ 등을 생산하고, 이러한 염증 관련 물질이 과도하게 분비되면 만성염증이 유발되는 것으로 알려져 있다(2-5).

LPS로 활성화된 대식세포는 염증성 물질뿐만 아니라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)을 과잉 생성하여 염증반응으로 인한 체내 산화적 스트레스를 증가시킨다. 이렇게 과잉 생성된 ROS와 RNS는 체내의 항산화 방어체제와 ROS 간의 불균형을 가져와 조직의 손상 및 DNA, 단백질, 지질의 손상을 유발한다. ROS는 암, 심혈관질환, 죽상 동맥경화증, 백내장 및 염증과 같은 다양한 심각한 질병의 발병 기전에서

Received 10 March 2017; Accepted 18 August 2017

Corresponding author: Ho-Kyung Kwak, Department of Human Ecology, Korea National Open University, Seoul 03087, Korea
E-mail: hkkwak@knou.ac.kr, Phone: +82-2-3668-4649

중요한 역할을 한다(4,5). 그러므로 항산화제가 풍부한 식이를 통한 체내 ROS 소거능 증가는 산화적 스트레스의 감소로 이어져 만성적인 염증반응을 감소할 수 있을 것으로 많은 연구에서 보고되었으며(2,4,6), 카로티노이드가 LPS로 자극한 대식세포에서 생성한 ROS를 제거시켜 산화적 스트레스에 인한 손상에 보호 효과가 있을 것으로 보고되었다(7,8).

카로티노이드(carotenoid)는 항산화능이 높은 것으로 알려진 지용성 색소로 지금까지 약 700개의 종류가 알려져 있고, 이 중에서 약 50개가 식품에 존재하고 체내 흡수와 대사를 할 수 있다. 그중 β -carotene, β -cryptoxanthin, α -carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin이 체내에 존재하는 전체 카로티노이드의 95% 양을 차지하는 것으로 보고된다(7,9). β -Carotene과 lycopene을 포함한 카로티노이드는 여러 세포 및 동물 실험에서 유의적으로 ROS가 감소하는 것으로 보고되었다. 또한, 임상실험에서 lycopene을 섭취한 군에서 혈액의 superoxide dismutase가 증가하였을 뿐만 아니라 DNA 손상이 감소하였다는 보고가 있다(10). 카로티노이드의 항산화 활성은 공액 이중결합 구조에서 기인한다고 알려져 있으며(10,11), 라디칼 분자에 전자를 공여함으로써 항산화 작용을 한다(12,13).

Highest occupied molecular orbital(HOMO)의 에너지 준위와 이온화 에너지는 전자 전이에 필요한 에너지를 나타내기 때문에 카로티노이드의 HOMO 에너지 준위 및 이온화 에너지는 카로티노이드의 항산화 활성을 나타내는 척도로 이용될 수 있다(14). 양자역학적 방법으로 계산한 HOMO 에너지 준위와 화학적 항산화 활성 사이에 상관관계가 있음이 보고되었으며(14), 본 연구진은 선행연구에서 양자역학적 방법으로 계산한 카로티노이드의 이차 이온화 에너지를 이용하여 항산화 활성을 정량적으로 해석할 수 있는 수학적 모델을 제시하였고 카로티노이드의 항산화 순위를 산출하였다(13). 본 연구에서는 상위를 차지한 β -carotene과 lycopene의 화학적 항산화능과 LPS로 염증을 유도하여 활성화된 RAW 264.7 세포에서의 산화적 스트레스와 DNA 손상 억제 효과를 분석하여 양자역학적 항산화능과 비교해보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

β -Carotene과 lycopene은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 대조군으로 (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid(Trolox, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. β -Carotene과 lycopene, Trolox는 모두 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co.)에 녹인 후, 세포 실험 시 DMSO의 최종 농도가 0.01% 이하가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다.

Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay

β -Carotene과 lycopene의 FRAP 측정은 Benzie와 Strain

(15)의 방법을 참고하였다. FRAP 측정 시 Chelex(2 g/L, 100 sodium form, Sigma-Aldrich Co.)로 만든 deionized water를 이용하여 모든 시료의 희석과 용액을 제조하였다. 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co.)을 40 mM HCl(Daejung Chemical & Metals Co., Siheung, Korea)에 녹여서 TPTZ 용액을 제조하였다. pH 3.6인 300 mM sodium acetate(Samchun Chemical Co., Pyeongtaek, Korea) 완충용액을 제조하였고, 실험 직전에 20 mM FeCl_3 (Sigma-Aldrich Co.) 용액을 제조하였다. Sodium acetate 완충용액, TPTZ 용액, FeCl_3 용액을 각각 10:1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 농도별 시료 30 μL 와 37°C의 TPTZ 용액 270 μL 를 동일온도(37°C)에서 15분간 반응시킨 후, microplate reader(CLARIOstar, BMG Labtech, Ortenberg, Germany)를 이용하여 593 nm에서 측정하였다. 표준물질은 1 mM Trolox를 사용하여 검량선을 작성하고 시료의 Trolox equivalent(TE)를 산출하였다.

DPPH free radical scavenging activity assay

Brand-Williams 등(16)의 방법에 따라 β -carotene과 lycopene의 DPPH free radical scavenging activity를 측정하였다. 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co.)을 methanol(Duksan Chemicals, Ansan, Korea)에 녹여 0.2 mM DPPH 용액을 제조하였다. Trolox를 비교물질로 사용하였다. 농도별 시료 50 μL 와 DPPH 용액 100 μL 를 첨가하고 상온의 암소에서 30분 반응시킨 후, microplate reader(BMG Labtech)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 다음의 식을 이용하여 DPPH free radical scavenging activity를 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity (\%)} = \frac{\{(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}) / \text{absorbance of control}\} \times 100}$$

세포 배양

본 연구에서 사용한 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받은 것으로 4~10 사이의 passage를 계대 배양하여 사용하였다. RAW264.7 세포는 DMEM(Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에 10% fetal bovine serum(Gibco), 1% penicillin/streptomycin(Gibco), 25 mM의 HEPES(Gibco)를 첨가하여 사용하였다. 배양 환경은 37°C의 5%의 CO_2 인큐베이터(HEPA Class 100, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)에서 배양하였다.

MTT assay

β -Carotene과 lycopene의 세포 독성은 Mosmann(17)의 방법에 따라 측정하였다. 배양한 RAW264.7 세포를 96-well plate에 각각 5×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 동

안 배양한 후 각 well의 배양액을 제거하고, β -carotene (0.4~4 μ M)과 lycopene(0.4~4 μ M)을 각각 무혈청 DMEM (Gibco) 배지를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 각 well에 10 μ L의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.)와 100 μ L의 무혈청 DMEM 배지를 넣어 2시간 동안 배양한 다음, 기존 배지를 제거하고 각 well에 100 μ L의 DMSO(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)를 넣고 20분 동안 상온에서 formazan을 용해한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 대조군 세포를 100%로 하였을 때와 비교하여 상대적인 세포 성장 억제율로 나타내었다. LPS(Sigma-Aldrich Co.)를 처리한 RAW264.7 세포의 독성을 확인하기 위해 위와 같은 MTT assay를 이용하였고 β -carotene(0.4~4 μ M)과 lycopene(0.4~4 μ M)을 농도별로 처리하여 4시간 배양한 다음 100 ng/mL의 LPS를 주입하고 20시간 배양하여 분석하였다.

Intracellular reactive oxygen species 측정

Black 96-well plate(clear bottom)에 5×10^4 cells/well의 RAW264.7 세포를 분주한 후 MTT와 같은 방법으로 배양하고, β -carotene(0.4~4 μ M)과 lycopene(0.4~2 μ M)을 각각 농도별로 처리하여 4시간 배양한 다음 100 ng/mL의 LPS를 주입하고 20시간 배양하여 분석하였다. Intracellular ROS 측정은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFDA)-Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit(Abcam, Cambridge, MA, USA)을 사용하였다. 배지를 제거한 후 100 μ L의 제공된 buffer로 배양이 끝난 세포를 씻었다. DCFDA가 희석된 용액 100 μ L를 넣고 45분 동안 37°C, 5%의 CO₂ 인큐베이터에서 반응시켰다. DCFDA가 희석된 용액을 제거한 후 100 μ L의 phosphate buffered saline(PBS, Gibco)을 넣고 microplate reader를 이용하여 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 ROS 생성량을 측정하였다.

DNA 손상 측정

β -Carotene과 lycopene의 DNA 산화 억제 효과를 Hoechst 염색을 이용하여 분석하였다. Black 96-well plate(clear bottom)에 5×10^4 cells/well의 RAW264.7 cell을 분주한 후 MTT와 같은 방법으로 배양하고, β -carotene(0.4~4 μ M)과 lycopene(0.4~2 μ M)을 각각 농도별로 처리하여 4시간 배양한 다음 100 ng/mL의 LPS를 주입하고 20시간 배양하여 분석하였다. 배지를 제거한 후, 30분 동안 Hoechst 33258(5 μ g/mL, Sigma-Aldrich Co.)을 넣은 100 μ L의 무혈청 배지에 넣어 인큐베이터에서 배양하고 PBS로 세포를 씻어낸 다음, microplate reader를 이용하여 well scanning 방법으로 excitation 355 nm, emission 460 nm에서 DNA 손상을 측정하였다. 또한, 형광현미경(FSX 100, Olympus, Tokyo, Japan)으로 DNA 손상을 관찰하였

다. Flow cytometry를 이용한 DNA 손상 측정 실험은 black 96-well plate에서 수확한 후, BD Accuri C6 flow cytometer(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 10,000개의 세포를 기준으로 FL-1으로 분석하였다.

통계분석

실험 결과의 통계처리는 SAS program(9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였다. ANOVA 통계 분석 결과 유의성이 있을 경우 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검토하였다($P < 0.05$).

결과 및 고찰

Chemical antioxidant activities

β -Carotene과 lycopene의 FRAP 결과는 Fig. 1과 같다. FRAP로 측정된 β -carotene과 lycopene의 항산화능은 농도 의존적으로 증가하였으며, 10 μ M의 농도에서 lycopene (9.9 mg/g TE)의 항산화능이 β -carotene(7.0 mg/g TE)보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$). β -Carotene과 lycopene의 항산화능은 Trolox(13.6 mg/g TE)보다는 유의적으로 낮았다($P < 0.05$). 그러나 DPPH free radical scavenging activity 방법에 의한 β -carotene과 lycopene의 항산화능은 차이가 없었고, 농도에 따른 유의적인 차이도 없었다(data not shown). Müller 등(7)의 연구에서 FRAP와 α -TEAC(α -tocopherol equivalent antioxidant capacity) 측정 시에는 n-hexane을, DPPH free radical scavenging activity 측정 시에는 ethanol/n-hexane(1:1; v/v)을 용매로 사용하였고 대조군으로 사용한 물질은 α -tocopherol이었다. 이 연구에서는 10 μ M의 농도에서 β -carotene의 α -TEAC는 3.1 mol α -TE/mol이며, lycopene의 경우 3.9 mol α -TE/mol이었다(Table 1). Jhin과 Hwang(13)의 선행 연구에서는 산화-환원 반응 등의 화학반응을 설명할 수 있

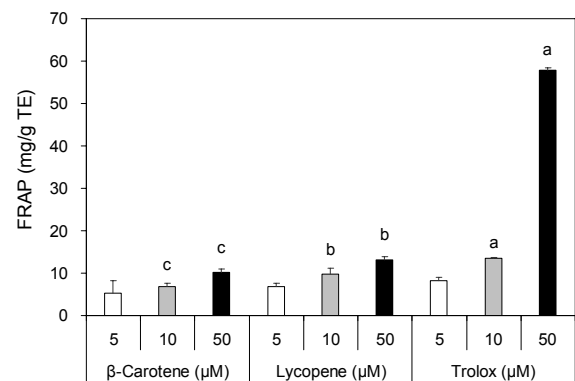


Fig. 1. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of β -carotene, lycopene, and Trolox. Values are means \pm standard deviations ($n=3$). Values with different letters within the same concentration differ significantly ($P < 0.05$) based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. TE: Trolox equivalent.

Table 1. Comparison with experimental and predicted antioxidant activities of β -carotene and lycopene

	Experimental antioxidant activity ¹⁾		Predicted antioxidant activity	
	FRAP ²⁾ (mg/g TE)	α -TEAC (mol α -TE/mol) by Müller et al. (7)	TEAC (mM) by Jhin and Hwang (13)	
			PM6	PM7
β -Carotene	8.2 \pm 2.6	3.1	3.15	3.21
Lycopene	11.54 \pm 1.9	3.9	3.89	3.89

¹⁾Treated concentration of β -carotene and lycopene was 10 μ M.

²⁾FRAP: ferric reducing antioxidant power, TE: Trolox equivalent, α -TEAC: α -tocopherol equivalent antioxidant capacity, α -TE: α -tocopherol equivalent, TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity, PM: parametric method.

는 변수(parametric method, PM6, PM7), 중성분자와 양이온의 양자화학적 기술인자를 포함하여 카로티노이드의 HOMO 에너지 준위 및 1차, 2차 이온화 에너지 등을 계산하였다. 양자역학적 결과는 β -carotene과 lycopene의 이차 이온화 에너지(PM6)가 각각 185.09 kcal/mol, 183.63 kcal/mol로 계산되었고, β -carotene의 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) 값은 3.15 mM이며 lycopene은 3.89 mM의 값으로 나타났다. 또한, PM7의 변수에서 β -carotene과 lycopene의 이차 이온화 에너지는 각각 189.71 kcal/mol과 186.43 kcal/mol이며, 이에 해당하는 TEAC 값은 β -carotene 3.21 mM이고 lycopene은 3.89 mM로 예측할 수 있다. 카로티노이드의 중성분자와 양이온의 이온화 에너지가 항산화 활성과 유의적인 상관관계가 있으며 이온화 에너지가 작을수록 전자이동이 쉬워져 라디칼 소거능이 높아 lycopene의 항산화능이 β -carotene보다 높은 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과는 양자역학적 방법으로 계산한 HOMO 에너지 준위와 화학적 항산화능 사이에 양의 상관관계가 성립하고 있음을 시사한다. 이 결과는 FRAP와 DPPH 분석방법에 의해서도 검증되었다. 이것은 양자역학적 방법으로 계산한 HOMO 에너지 준위와 화학적 항산화능 사이에 양의 상관관계가 있음을 보고한 선행연구와도 유사한 결과이다(Table 1)(13). Soffers 등(14)은 β -carotene과 lycopene의 HOMO 에너지 준위는 각각 -7.776 eV, -7.833 eV로 계산되었으며, β -carotene과 비

교하였을 때 상대적으로 높은 HOMO 에너지 준위를 띤 lycopene이 항산화능 역시 높다고 보고하였다.

MTT assay

β -Carotene과 lycopene의 세포 독성을 알아보기 위해서 MTT assay를 진행하였다(17). β -Carotene과 lycopene은 각각 4 μ M 이하 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(data not shown). 또한, β -carotene과 lycopene을 0.4, 1, 2, 4 μ M 농도로 처리한 세포에 100 ng/mL의 LPS를 처리한 세포에서의 세포 독성을 확인한 결과, 4 μ M의 lycopene에서 세포 독성(90% 이하)이 발견되었다(Fig. 2). 그러므로 4 μ M의 lycopene은 향후 실험에서 제외하였다. 대조군으로 사용한 Trolox는 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다.

Intracellular ROS 측정

LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 β -carotene과 lycopene의 산화적 스트레스 저하 효과를 확인하고자 DCFDA 염색법을 이용하여 intracellular ROS 생성량을 두 가지 방법으로 측정하여 비교하였다. 먼저 microplate reader의 end point 방법으로 형광세기를 측정하여 세포 내 ROS 생성을 확인한 결과, LPS를 처리한 RAW264.7 세포의 intracellular ROS 생성량이 LPS를 처리하지 않은 세포보다 유

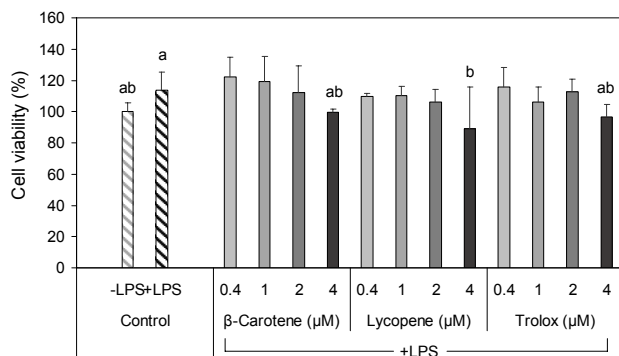


Fig. 2. The viability of LPS (100 ng/mL)-stimulated RAW264.7 cells pretreated with β -carotene, lycopene, and Trolox. Values are means \pm standard deviations (n=3). Values with different letters within the same concentration differ significantly ($P<0.05$) based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

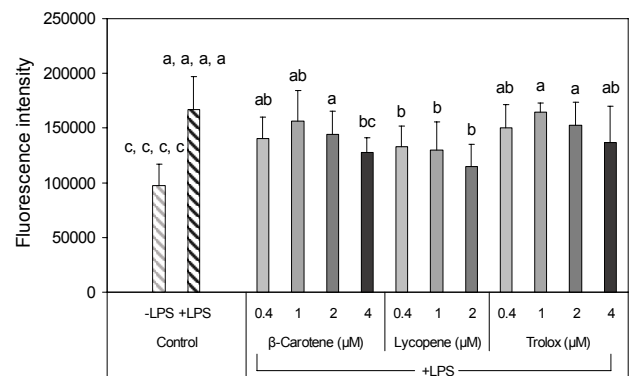


Fig. 3. Intracellular reactive oxygen species generation status in LPS (100 ng/mL)-stimulated RAW264.7 cells pretreated with β -carotene, lycopene, and Trolox. Values are means \pm standard deviations (n=6). Values with different letters within the same concentration differ significantly ($P<0.05$) based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

의적으로 많았다($P < 0.05$, Fig. 3). LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 0.4~4 μM β -carotene을 전처리한 결과, 모든 처리 농도에서 LPS만 처리한 군보다 ROS의 생성이 감소하는 경향이 나타났고 4 μM 에서만 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 또한, 0.4~2 μM 농도의 lycopene을 세포에 처리한 군은 모든 농도에서 LPS만 처리한 군보다 유의적으로 ROS 생성이 감소하였다($P < 0.05$). Trolox는 모든 농도 구간에서 LPS를 처리한 RAW264.7 세포와 유의적인 차이가 없었고 β -carotene과 lycopene보다 ROS의 생성량이 높았다. RAW264.7 세포에 처리한 β -carotene, lycopene, Trolox를 비교하였을 때 lycopene을 처리한 세포가 β -carotene, Trolox를 처리한 세포보다 intracellular ROS 생성량이 적음을 알 수 있었다. Mekhora 등(6)의 연구에서 β -carotene이 포함되어 있는 *E. foetidum* 추출물을 LPS로 자극한 대식세포에 처리하였을 때 interleukin-6, tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 등 염증 관련 물질이 줄어들었고, ROS 생성이 감소하였다. Zou 등(8)의 연구에서도 LPS로 염증을 유도한 RAW264.7 세포에 lycopene(1, 5, 10 μM)을 처리하였을 때 ROS 생성이 감소하였다. 하지만 이 연구는 본 연구와는 다르게 lycopene을 0.0025%의 butylated hydroxytoluene이 포함되어 있는 tetrahydrofuran 용매에 녹였다.

두 번째로 microplate reader의 well scan 방법으로 ROS의 생성을 확인하였고, 96-well plate 각각의 well을

5×5 구획으로 나누어 각각의 형광량을 측정하는 방법으로 수행하였다. 기존의 end point 측정 조건에서는 각 well의 중앙 단일지점에서만 형광을 측정하므로, 본 연구에서처럼 부착세포가 있는 상태로 분석하는 경우에는 부적절하다. 그 이유는 측정되는 세포로 인해 plate의 바닥이 균일하지 않고 세포의 밀집 정도가 구획별로 다르기 때문에 well 측정지점인 중앙에 세포가 없을 수 있기 때문이다(19). Well scan을 이용하여 분석한 결과 3D로 표현된 면적의 색이 진할수록 산화적 스트레스, 즉 ROS의 생성이 높다는 것을 의미하며, end point 방법으로 측정된 결과와 마찬가지로 RAW264.7 세포에 100 ng/mL의 LPS를 처리하였을 때 처리하지 않은 군에 비해 색이 진하게 나타나 세포 내 ROS의 생성이 높다는 것을 알 수 있다. 이때 표현되는 구조는 각각의 well에 존재하는 RAW264.7 세포의 분포를 알 수 있다. 또한, 2 μM 의 농도로 β -carotene과 lycopene을 처리한 RAW264.7 세포를 비교하였을 때 lycopene 처리 세포가 β -carotene 처리 세포보다 ROS 생성량이 적음을 알 수 있으며, end point의 결과와 유사한 것으로 나타났다. Trolox를 처리한 세포는 β -carotene을 처리한 세포와 색이 유사하였고 lycopene과 비교하였을 때 더 진한 색을 나타냈다(Fig. 4).

DNA 손상 측정

β -Carotene과 lycopene의 DNA 산화 억제 효과를 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 확인하고자 Hoechst 염색법을 이용하였으며, 형광현미경, microplate reader, flow

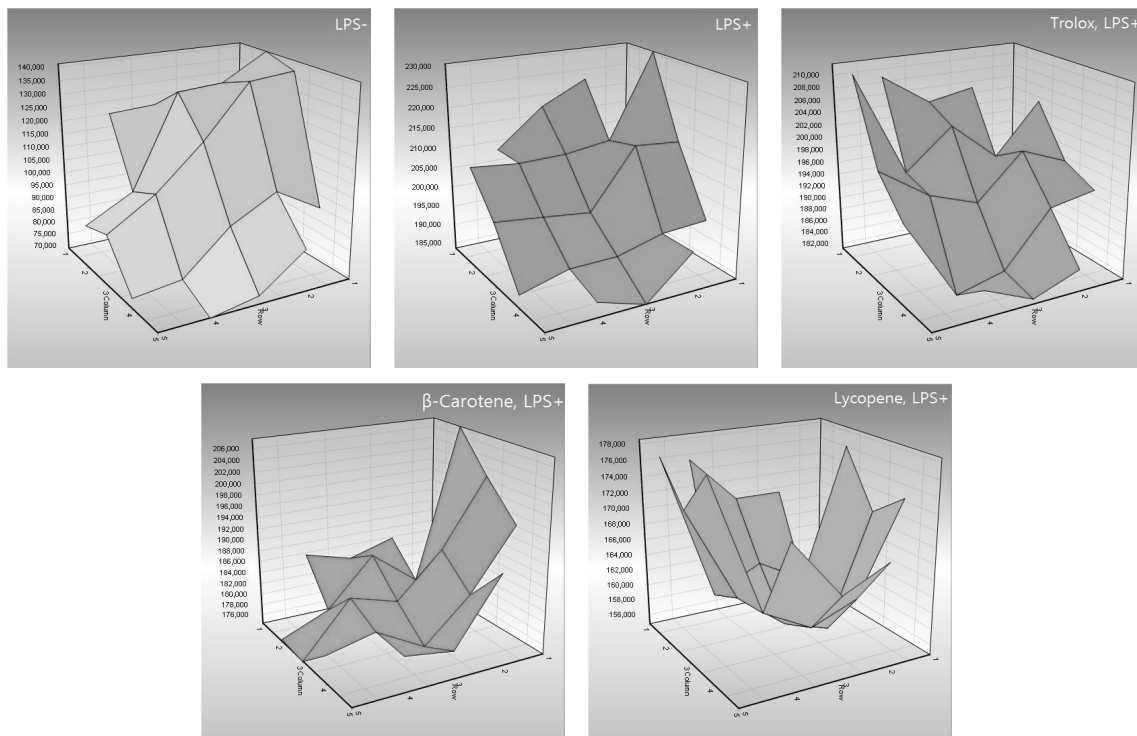


Fig. 4. Intracellular reactive oxygen species generation status in LPS (100 ng/mL)-stimulated RAW264.7 cells pretreated with 2 μM of β -carotene, lycopene, and Trolox, determined by well scan images of microplate reader.

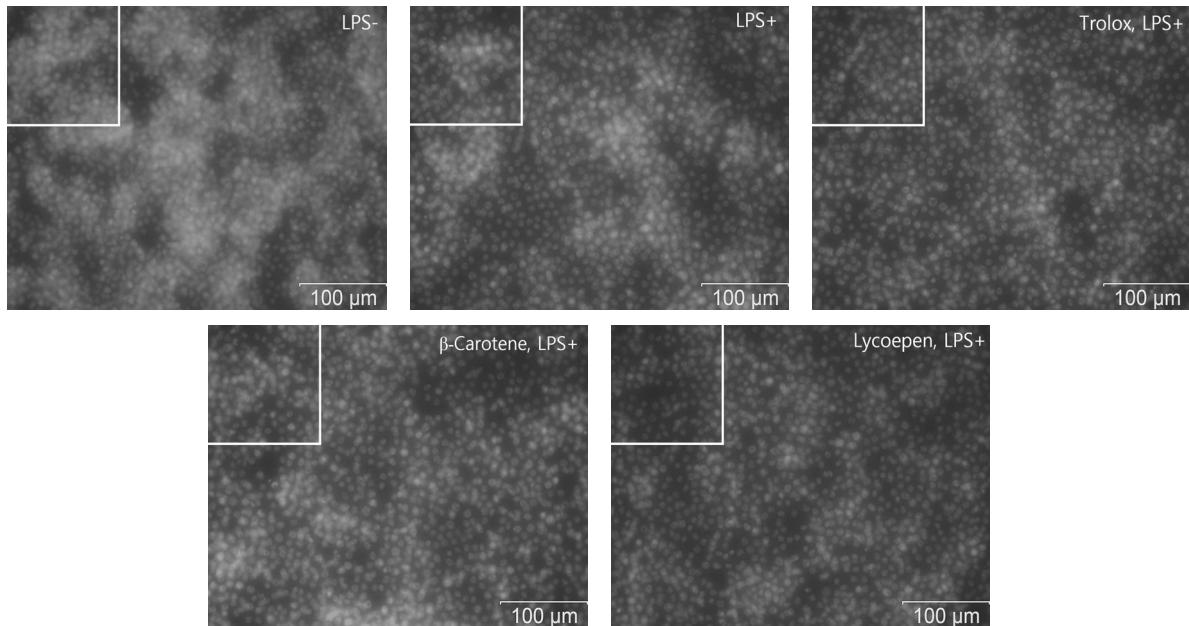


Fig. 5. Intracellular DNA fragmentation (Hoechst) in LPS (100 ng/mL)-stimulated RAW264.7 cells pretreated with 2 μ M of β -carotene, lycopene, and Trolox, determined by fluorescence microscope. A square of left upper side indicates for comparing with the brightness of cells of each group.

cytometry를 이용한 세 가지 방법으로 DNA 손상 정도를 측정하였다.

형광현미경으로 Hoechst로 염색한 세포의 핵을 관찰하였을 때 100 ng/mL의 LPS를 처리한 군에서 DNA의 분절이 많은 것을 보아 DNA가 손상된 것을 알 수 있었다. 2 μ M의 농도로 RAW264.7 세포에 처리한 β -carotene과 lycopene을 비교하였을 때 lycopene을 처리한 세포의 DNA가 β -carotene을 처리한 세포보다 DNA 손상 정도가 적음을 알 수 있었고 Trolox는 lycopene보다는 DNA 손상이 많으며, β -carotene과 비교하였을 때 DNA 분절이 적은 것으로 관찰된다(Fig. 5).

96-well plate 각각의 well을 10×10 구획으로 나눠서 well scan 방법으로 측정한 결과(Fig. 6), 형광현미경의 관찰 결과와 유사하게 lycopene을 처리한 세포가 색이 얼어서 β -carotene을 처리한 세포보다 DNA 손상이 적은 것을 관찰할 수 있었다. Trolox는 β -carotene과 비슷하였고 lycopene에 비해서 진한 색이었다. LPS를 처리하지 않은 세포의 경우 형광현미경과 well scan으로 측정하였을 때 색이 가장 밝고 진하게 나타났다(Fig. 5, 6). 이는 형광촬영을 할 때 Hoechst 염색이 된 살아있는 세포수가 DNA 손상에 의해 분절이 된 세포보다 상대적으로 많기 때문이라고 추정되며, 이로 인해 현미경 관찰 시 가장 밝게 관찰되고 microplate reader로 측정하였을 때 색이 진하게 나타났다(20). 그래서 flow cytometry를 이용하여 각 그룹의 세포 수를 10,000개의 기준으로 DNA 손상을 측정한 결과(Fig. 7), 100 ng/mL의 LPS를 처리한 군이 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 DNA 손상 정도가 높았지만(P <

0.05), β -carotene과 lycopene 그리고 Trolox를 처리한 RAW264.7 세포의 경우 LPS만 처리한 군과 비슷하였고 또 시료 간의 유의적인 차이가 없었다.

본 연구에서는 대식세포에서 DNA 손상 정도를 측정하였고, β -carotene과 lycopene의 처리가 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 Cui 등(21)의 연구에 따르면 Hoechst 염색의 결과를 통해 β -carotene이 암세포에서 세포사멸에 관여한다는 보고가 있고, Qu 등(22)의 연구에 의하면 trimethyltin으로 신경독성을 유도한 신경세포에서 lycopene이 신경세포를 보호한다는 보고가 있다. 또한, Pool-Zobel 등(23)의 연구에서 임상시험자에게 토마토주스(40 mg lycopene), 당근주스(22.3 mg β -carotene) 등을 2주 동안 섭취시킨 결과, 백혈구의 DNA 손상이 유의적으로 감소하였다.

선행 연구에서 양자역학적 방법으로 β -carotene과 lycopene의 항산화능을 비교한 결과(13) lycopene의 항산화능이 β -carotene보다 높은 것으로 나타났으며, 본 연구의 화학적 결과에서도 FRAP 방법에 의해 lycopene의 항산화능이 β -carotene보다 높은 것으로 동일하게 검증되었다. 하지만 β -carotene과 lycopene의 화학적인 항산화능은 Trolox보다 유의적으로 낮은 수준이었다(P < 0.05). LPS로 염증반응을 유도한 RAW264.7 세포는 세포 내 ROS와 DNA 손상이 유의적으로 증가하였다. β -Carotene과 lycopene으로 각각 세포에 전처리하고 LPS로 자극을 한 RAW264.7 세포에서는 ROS 생성이 유의적으로 감소하였고, Trolox는 세포 내 산화적 스트레스를 유의적으로 감소시키지 않았다. 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상에서는 β -carotene, ly-

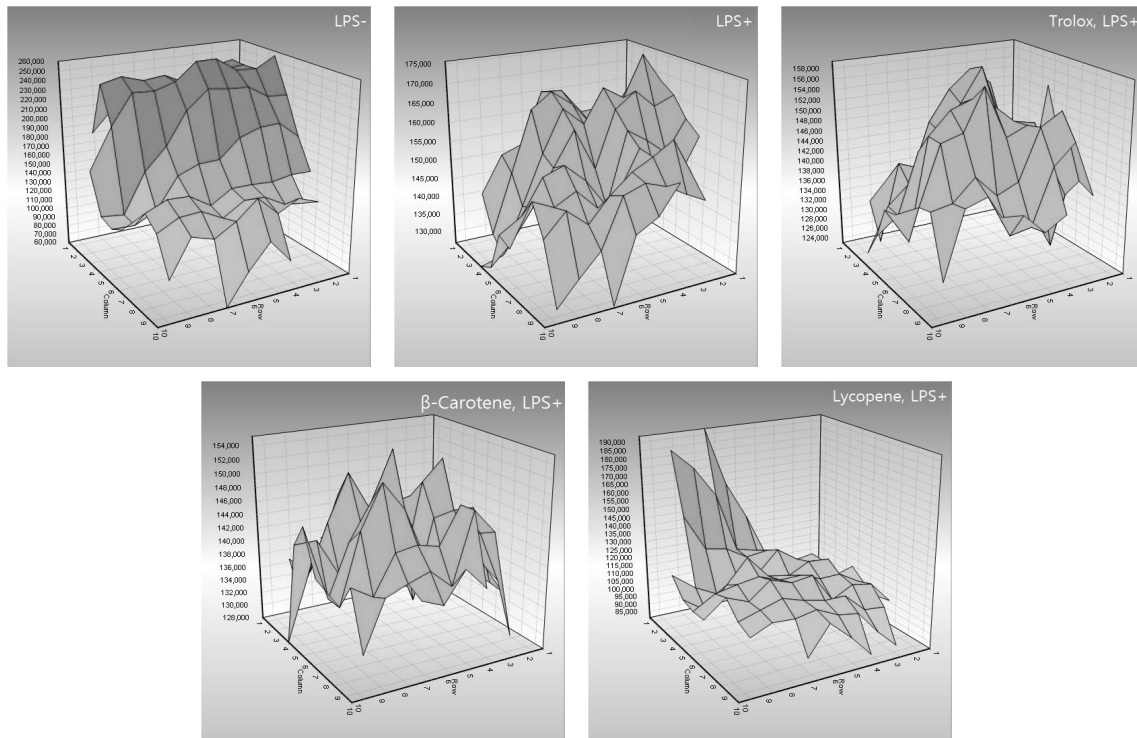


Fig. 6. Intracellular DNA fragmentation (Hoechst) in LPS (100 ng/mL)-stimulated RAW264.7 cells pretreated with 2 μM of β-carotene, lycopene, and Trolox, determined by well scan images of microplate reader.

copene, Trolox 모두 DNA 산화 억제 효과가 없었다. 그러므로 정량적 구조-활성 관계 방법과 FRAP로 측정한 화학적 방법으로 측정되는 항산화능은 비슷한 결과를 나타내지만 실제 세포 내에서의 항산화능과는 차이가 있으며, 이러한 본 연구의 결과를 배경으로 염증 상태에서 나타나는 β-carotene과 lycopene의 산화적 손상 억제 효과뿐만 아니라 염증반응에서 일어나는 항산화 방어체계의 신호 전달이나 산화환원반응에 이들 카로티노이드가 미치는 영향에 대한 깊이 있는 연구가 필요한 것으로 보인다.

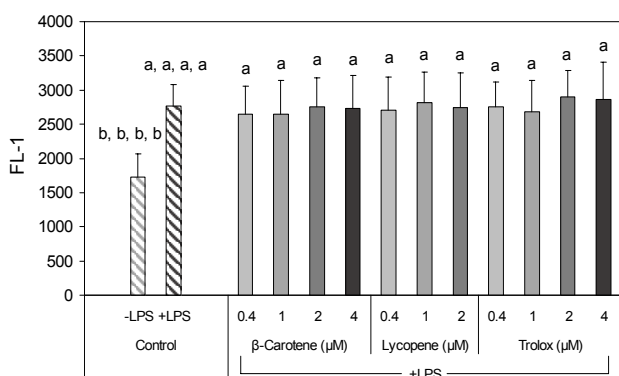


Fig. 7. Intracellular DNA fragmentation (Hoechst) in LPS (100 ng/mL)-stimulated RAW264.7 cells pretreated with β-carotene, lycopene, and Trolox. Values are means±standard deviations (n=4). Values with different letters within the same concentration differ significantly ($P<0.05$) based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

요 약

본 연구는 β-carotene과 lycopene의 양자역학 및 화학적 항산화능과 세포 내 항산화 효과를 분석하였다. β-Carotene과 lycopene의 항산화능을 양자역학적으로 비교한 결과 lycopene의 항산화능이 β-carotene보다 높은 것으로 나타났으며, 이러한 항산화능의 차이는 FRAP로 측정하였을 때도 유사하게 관찰되었다. Trolox와 비교했을 때 β-carotene과 lycopene의 FRAP 수치는 유의적으로 낮았으나 LPS에 의한 세포 내 ROS 생성을 낮추는 데는 두 카로티노이드가 더 우수한 것으로 나타났다. 그러므로 본 연구에서 비교한 β-carotene과 lycopene의 양자역학적 항산화능은 화학적 항산화능을 일부 반영하지만, 실제 세포 내 ROS에 의한 산화스트레스 저하 효과와는 차이가 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2015년 한국방송통신대학교의 학술연구비 지원을 받아 작성된 것임.

REFERENCES

1. Tak PP, Firestein GS. 2001. NF-κB: A key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7-11.
2. Jung H, Lee K, Hwang KT, Kwak HK. 2015. Antioxidant

- properties of polyphenol fractions from cranberry powder in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1241-1247.
3. Jacob RA, Burri BJ. 1996. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* 63: 985S-990S.
 4. Ishii T, Itoh K, Sato H, Bannai S. 1999. Oxidative stress-inducible proteins in macrophages. *Free Radic Res* 31: 351-355.
 5. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100: 171-194.
 6. Mekhora C, Muangnoi C, Chingsuwanrote P, Dawilai S, Svasti S, Chasri K, Tuntipopipat S. 2012. *Eryngium foetidum* suppresses inflammatory mediators produced by macrophages. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 653-664.
 7. Müller L, Fröhlich K, Böhm V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chem* 129: 139-148.
 8. Zou J, Feng D, Ling WH, Duan RD. 2013. Lycopene suppresses proinflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by inhibiting ROS-induced trafficking of TLR4 to lipid raft-like domains. *J Nutr Biochem* 24: 1117-1122.
 9. Kaulmann A, Bohn T. 2014. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress: Implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res* 34: 907-929.
 10. Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9: 1551-1558.
 11. Krinsky NI, Deneke SM. 1982. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J Natl Cancer Inst* 69: 205-210.
 12. Cantrell A, McGarvey DJ, Truscott TG, Rancan F, Böhm F. 2003. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Arch Biochem Biophys* 412: 47-54.
 13. Jhin C, Hwang KT. 2015. Adaptive neuro-fuzzy inference system applied QSAR with quantum chemical descriptors for predicting radical scavenging activities of carotenoids. *PLoS One* 10: e0140154.
 14. Soffers AE, Van Haandel MJ, Boersma MG, Tyrakowska B, Laane C, Rietjens IM. 1999. Antioxidant activities of carotenoids: quantitative relationships between theoretical calculations and experimental literature data. *Free Radic Res* 30: 233-240.
 15. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
 16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28: 25-30.
 17. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
 18. Katsuura S, Imamura T, Bando N, Yamanishi R. 2009. β -Carotene and β -cryptoxanthin but not lutein evoke redox and immune changes in RAW264 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res* 53: 1396-1405.
 19. Youkahana E, Gagliardi F, Geso M. 2016. Two-dimensional scanning of PRESAGE[®] dosimetry using UV/VIS spectrophotometry and its potential application in radiotherapy. *Biomedical Physics & Engineering Express* 2: 045009.
 20. Latt SA, Stetten G. 1976. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Histochem Cytochem* 24: 24-33.
 21. Cui Y, Lu Z, Bai L, Shi Z, Zhao WE, Zhao B. 2007. β -Carotene induces apoptosis and up-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and reactive oxygen species production in MCF-7 cancer cells. *Eur J Cancer* 43: 2590-2601.
 22. Qu M, Zhou Z, Chen C, Li M, Pei L, Chu F, Yang J, Wang Y, Li L, Liu C, Zhang L, Zhang G, Yu Z, Wang D. 2011. Lycopene protects against trimethyltin-induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons by inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurochem Int* 59: 1095-1103.
 23. Pool-Zobel BL, Bub A, Müller H, Wollowski I, Rechkemmer G. 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 18: 1847-1850.