

살리칠산디셀렌화합물의 몇가지 시험관내 항산화능에 대한 연구

한경애, 류은혜

살리칠산디셀렌화합물(Sa-di: 5-(3-카르복시-4-히드록시-페닐)디셀라닐-2-히드록시-안식향산)은 글루타티온페록시다제(GPx)모의물로 새롭게 개발된 5-셀렌화살리칠산 유도체의 한가지로서 뇌졸중치료에 리용되고있는 엽셀렌에 비하여 4.2배 높은 GPx활성을 가진다는것이 밝혀졌다.[7]

우리는 이미 MPP⁺-흰생쥐태아중뇌도파민성세포 및 로테논-흰생쥐신경아중세포계열 N18TG2를 리용한 뇌신경세포손상모형계에서 살리칠산디셀렌화합물(Sa-di)이 뇌신경세포에 대한 보호작용을 나타내며 그 물질새가 세포내에서 활성산소산생의 억제와 그로 인한 과산화손상의 방지, 사립체분해 및 아포토시스유발의 억제와 관련되어있다는것을 밝혔다.[1, 2]

우리는 활성산소산생과 그로 인한 세포의 산화적스트레스를 방지하는데서 이 물질의 직접적인 작용을 밝히기 위하여 몇가지 시험관내항산화능을 검토하여보았다.

재료 및 방법

살리칠산디셀렌화합물(Sa-di: 5-(3-카르복시-4-히드록시-페닐)디셀라닐-2-히드록시-안식향산)은 선행방법[7]으로 합성분리한 표품을 리용하였다.

안정유리라디칼소거능은 DPPH법[3, 4]으로, 초산소음이온소거능은 NBT법[6]으로, 히드록시라디칼소거능은 사푸라닌법[9]으로 측정하였으며 과산화수소분해능은 과산화수소에 의한 240nm에서의 흡광도변화를 직접 측정[10]하여 평가하였다.

히드로과산화물소거능은 3급-부틸히드로과산화물(t-BuOOH)을 기질로 하는 글루타티온페록시다제(GPx)활성으로 결정[8]하였다.

결과 및 론의

1) 안정유리라디칼소거능

안정유리기를 가진 α , α' -디페닐피크릴히드라질(DPPH)에 대한 소거능력은 항산화제의 수소제공능력을 신속히 평가할수 있는 방법으로서 항산화활성평가에 널리 리용된다. 그러므로 우리는 무엇보다먼저 DPPH법으로 Sa-di의 안정유리라디칼소거능을 검토하여보았다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 Sa-di는 반응계안에서 2.5mmol/L까지의 농도범위에서 안정유리라디칼(DPPH)에 대한 소거능을 전혀 나타내지 않았다.

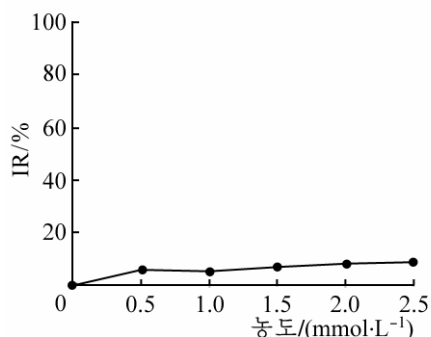


그림 1. Sa-di의 농도에 따르는
DPPH소거률변화

2) 초산소음이온소거능

O_2^- 는 분자산소(O_2)의 1전자환원에 의하여 1차적으로 생겨나는 활성산소로서 그 자체는 그리 큰 산화적피해를 주지 않지만 $\cdot OH$ 나 H_2O_2 과 같은 다른 반응성이 높은 활성 산소를 만들어내어 산화손상을 일으킬수 있다.[12] 그러므로 O_2^- 소거능은 항산화제의 활성산소소거능을 평가하는 중요한 지표의 하나이다.

Sa-di의 O_2^- 에 대한 소거능을 NBT법으로 평가한 결과는 그림 2와 같다.

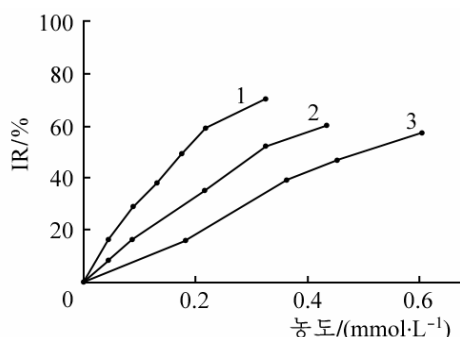


그림 2. Sa-di의 농도에 따르는 O_2^- 소거률변화
1-Sa-di, 2-SA, 3-Asc

그림 2에서 보는바와 같이 Sa-di의 O_2^- 에 대한 소거률은 반응계안에서 2.5mmol/L까지의 범위에서 농도의존적으로 높아졌다. 50%근방에서 얻은 회귀 방정식으로부터 계산한 IC_{50} 값으로부터 우리는 Sa-di의 O_2^- 소거능이 0.178mmol/L로서 아스코르빈산(Asc)의 2.8배라는것을 알수 있다.

같은 반응조건에서 Sa-di의 O_2^- 소거능은 살리칠산(SA)보다 1.78배 높았다. Sa-di 1분자는 살리칠산 두 분자를 포함하고있으며 Sa-di의 O_2^- 소거능이 살리칠산의 거의 2배라는 사실로부터 Sa-di의 O_2^- 소거능이 살리칠산의 $-OH$ 기에 의한것이라고 예측할수 있다.

3) 히드록시라디칼소거능

$\cdot OH$ 는 활성산소들가운데서 반응성이 가장 높기때문에 세포성분들에 대한 강한 산화적손상을 일으킬수 있다.[12] 그러므로 $\cdot OH$ 소거활성은 항산화제의 항산화능력을 평가하는 중요한 지표로 된다.

이로부터 우리는 Sa-di의 $\cdot OH$ 소거능을 사프라닌법으로 평가하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 Sa-di의 $\cdot OH$ 소거률은 0.4mmol/L의 농도범위에서 거의 선형적으로 증가하였다. 50%근방에서 얻은 회귀방정식으로부터 IC_{50} 값을 계산해본 결과 0.168mmol/L로서 같은 방법으로 계산한 살리칠산의 $\cdot OH$ 소거능($IC_{50}=94.5mmol/L$)에 비하여 훨씬 높았다. 이로부터 Sa-di의 히드록시라디칼소거능이 살리칠산의 분자 내히드록실기와 $\cdot OH$ 와의 반응보다 Se의 촉매작용에 의한것이라는것을 알수 있다.

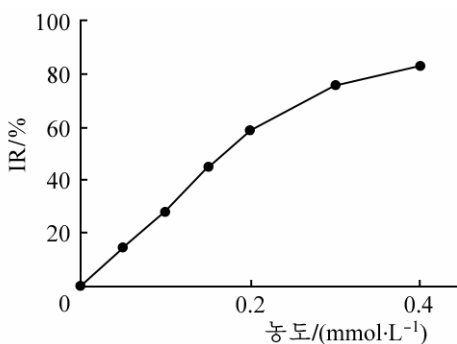


그림 3. Sa-di의 농도에 따르는 $\cdot OH$ 소거률변화

4) 과산화수소분해능

과산화수소(H_2O_2)는 생체분자들과의 직접적인 반응성은 낮지만 SH기를 가진 일부 효소들을 불활성화시키며 반감기가 길기때문에 철과 같은 과도금속과 반응하여 $\cdot OH$ 와 같은 반응성이 높은 활성산소들을 만들어냄으로써 산화적손상을 일으킬수 있다.[12]

Sa-di의 H_2O_2 분해능을 240nm에서의 흡광도변화로써 측정한 결과는 그림 4와 같다.

반응계속에서 Sa-di의 농도를 2.5mmol/L 까지 높였지만 그림 4에서 보는바와 같이 흡광도변화는 없었다. 이것은 이 농도범위에서 Sa-di가 그자체로서는 과산화수소분해능을 가지지 않는다는것을 보여준다.

5) 히드로과산화물소거능

기름질과산화산물로 생겨나는 히드로과산화물은 과도금속과 반응하여 페록시라디칼을 생성시키며 이 페록시라디칼들은 단백질들에 대한 산화적손상을 일으킨다. 그러므로 우리는 Sa-di의 히드로과산화물소거능을 글루타티온이 있는 조건에서 t-BuOOH를 기질로 하는 글루타티온 페록시다제활성으로 평가하여보았다.(그림 5)

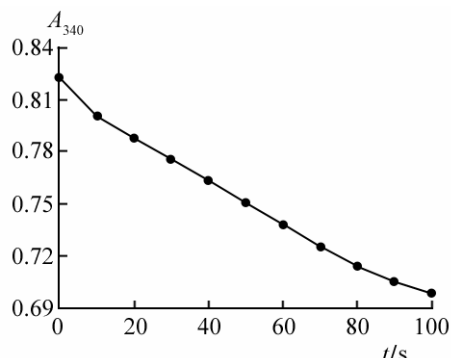


그림 5. 시간에 따르는 340nm에서의 흡광도변화
sa-di : 5 μ mol/L

전성과 약리학적특성이 밝혀졌으며 현재 뇌신경보호제로서 임상검토단계에 있다.[5] 엽셀렌류사체들과 다른 많은 셀렌GPx모의물들이 개발되었지만 그 생물학적응용은 제한을 받고있다.

독성이 낮은 살리칠산 및 그 아미노산유도체들을 리용하여 한단계반응을 거쳐 합성한 여러가지 5-셀렌화살리칠산유도체들가운데서 Sa-di는 가장 높은 GPx활성을 나타내며[7] 세포모형계를 리용한 실험에서 신경세포에 대한 뚜렷한 보호작용을 보여주었다.[1, 2] MPP⁺-흰생쥐태아중뇌도파민성세포 및 로테논-흰생쥐신경아종세포계열 N18TG2을 리용한 뇌신경세포손상모형계에서 Sa-di는 수 μ mol/L의 농도에서 세포내활성산소산생과 그로 인한 막기름질의 과산화손상방지, 사립체의 구조적손상과 아포토시스유발억제의 물림새로 뇌신경세포에 대한 보호작용을 나타내었다.

우리는 세포안에서 Sa-di의 항산화작용이 직접적으로 무엇에 의한것인가를 밝히기 위하여 시험관내에서 그 항산화능을 검토하여보았다. 우리의 실험결과는 Sa-di가 1mmol/L이하의 농도범위에서 \cdot OH, O₂⁻에 대한 일정한 소거능을 가지며 글루타티온의 존재하에 기름

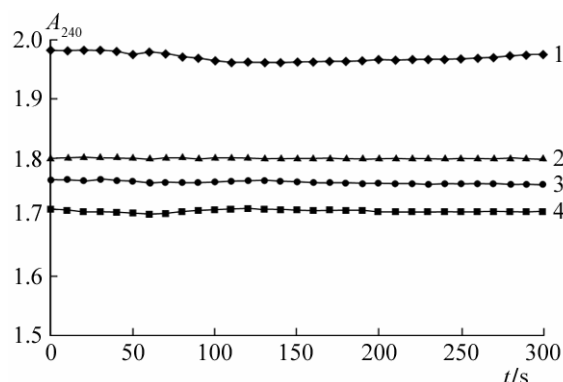


그림 4. 각이한 과산화수소농도처리구에서 시간에 따르는 240nm에서의 흡광도변화
1-2.5mmol/L, 2-50 μ mol/L, 3-10 μ mol/L, 4-공백구

그림 5의 측정값으로부터 5 μ mol/L의 농도에서 Sa-di의 히드로과산화물소거속도는 25.1 μ mol/(L \cdot min)으로 계산되었다. 이것은 엽셀렌(5.91 μ mol/L)의 약 4.2배로서 선행연구자료[7]와 잘 일치한다. 한편 살리칠산은 히드로과산화물소거능을 전혀 나타내지 않았다.

GPx는 항산화방어제의 중요한 구성성분이며 대부분 셀레노시스테인을 활성중심에 가지고있다.[11] 셀렌을 함유한 많은 저분자물질들도 역시 전자내줄체가 있는 조건에서 GPx활성을 가지며 따라서 여러가지 비효소적GPx모의물들을 개발하여 질병치료에 리용하기 위한 연구들[8]이 진행되었다.

셀렌유기화합물들가운데서 엽셀렌의 생물학적인

질히드로과산화물에 대한 분해능은 높지만 안정유리라디칼소거능과 과산화수소분해능은 가지지 않는다는것을 보여준다. 살리칠산과의 대비결과는 Sa-di의 $\cdot\text{OH}$ 에 대한 소거능은 Se보다 살리칠산의 기능원자단에 의한것이며 O_2^- 과 히드로과산화물에 대한 소거능은 셀렌원자의 촉매작용에 의한것이라는것을 보여준다.

셀렌을 올리고키토산을 리용하여 유기화한 선행연구자료[4]에 의하면 셀렌화올리고키토산의 시험관내항산화능은 담체인 올리고키토산과 거의 같았다. 이것은 우리의 실험결과와 부분적으로 일치한다.

결국 세포모형계에서 관찰된 Sa-di의 항산화능은 이 화합물이 생체안에서 글루타티온의 존재하에 가지게 되는 GPx활성과 약간의 $\cdot\text{OH}$ 및 O_2^- 에 대한 소거능에 의한것이라는것을 알수 있다.

맺는 말

1) Sa-di는 2.5mmol/L까지의 농도범위에서 안정유리라디칼(DPPH)에 대한 소거능과 과산화수소(H_2O_2)분해능을 거의 나타내지 않는다.

2) Sa-di의 초산소음이온(O_2^-)에 대한 IC_{50} 값은 0.178mmol/L, $\cdot\text{OH}$ 에 대한 IC_{50} 값은 0.168mmol/L로서 1mmol/L이하의 농도에서 Sa-di는 O_2^- 과 $\cdot\text{OH}$ 에 대한 일정한 소거능을 가진다.

3) 글루타티온이 있는 조건하에서 Sa-di(5 $\mu\text{mol/L}$)는 25.1 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 이라는 높은 히드로과산화물소거속도를 가진다.

참고 문헌

- [1] 한경애 등; 생물학, 4, 101, 주체103(2014).
- [2] 류은혜 등; 생물학, 1, 17, 주체104(2015).
- [3] 리희영 등; 조선생물공학학회지, 3, 46, 주체97(2008).
- [4] W. Brand-Williams et al.; Afr. J. Biotech., 32, 43, 2008.
- [5] F. Carbone et al.; Antioxid. Redox Signal., 4, 22, 2014.
- [6] C. C. Winterborn et al.; J. Lab. Clin. Med., 85, 337, 1975.
- [7] S. C. Yu et al.; Org. Biomol. Chem., 8, 823, 2010.
- [8] S. C. Yu et al.; Chem. Eur. J., 14, 7066, 2008.
- [9] I. Fridovich; J. Biol. Chem. 248, 8, 2645, 1973.
- [10] Jr. R. F. Beers et al.; J. Biol. Chem., 195, 133, 1952.
- [11] D. P. Gelain et al.; Front Biosci., 14, 1, 4457, 2009.
- [12] 中村三千男; 蛋白質核酸酵素, 50, 4, 297, 2005.

On Some Antioxidant Abilities of Salicylic Diselenide *in vitro* Condition

Han Kyong Ae, Ryu Un Hye

We have already elucidated that salicylic diselenide(Sa-di: 5-(3-carboxy-4-hydroxy-phenyl)diselanyl-2-hydroxy-benzoic acid), a new glutathione peroxidase mimic, exhibits the protective effects on neurons in cellular models.

Here, in order to elucidate the direct effects of this compound in preventing ROS production leading to oxidative stress of cell, we examined its some antioxidant abilities *in vitro* condition.

Sa-di doesn't exhibit ability of scavenging stable free radical (DPPH) and decomposing hydrogen peroxide within 2.5mmol/L of its concentration. But under the concentration of 1mmol/L it has some scavenging ability on superoxide(O_2^-) and hydroxyl radical($\cdot OH$). Its scavenging speed on hydroperoxide is $25.1\mu mol/(L \cdot min^{-1})$ in the presence of glutathione.

Key words: salicylic diselenide, glutathione peroxidase mimic, antioxidant ability