

## 인돌 유도체들의 항산화 작용기전

부산대학교 약학대학 약학부, <sup>1</sup>부산대학교 의과대학, <sup>2</sup>연세대학교 생명공학과  
<sup>3</sup>부경대학교 식품생명과학과, <sup>4</sup>부산대학교 식품영양학과

성도유 · 박진생<sup>1</sup> · 김명정<sup>1</sup> · 노재경 · 양영환 · 백기주  
양 응<sup>2</sup> · 최진호<sup>3</sup> · 이숙희<sup>4</sup> · 정해영

### Antioxidative Mechanism of Indole Derivatives

Do Yu Soung, Jin Seug Park<sup>1</sup>, Myung Jung Kim<sup>1</sup>, Jae Kyung No,  
Young Hwan Yang, Kee Joo Paik, Ryung Yang<sup>2</sup>, Jin Ho Choi<sup>3</sup>,  
Sook Hee Rhee<sup>4</sup> and Hae Young Chung

Faculty of Pharmacy, <sup>1</sup>School of Medicine, Pusan National University, Pusan

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul

<sup>3</sup>Department of Food and Life Science, Pukyong National University, Pusan

<sup>4</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan, Korea

Reactive oxygen species (ROS) mediate reactions which can damage a variety of critical biological molecules including DNA, proteins, and lipids. The present study was carried out to investigate the scavenging activities of indole derivatives against ROS and their scavenging mechanisms. Thus, eight indole derivatives were screened for the scavenging effects against  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ , and ROS. Among them, indole derivatives with a hydroxyl group at the position 5 showed the strongest scavenging activity. 5-Hydroxyl indole derivatives significantly protected cultured PC12 and CPAE from damage induced by *t*-butylhydroperoxide (BHP). Especially, serotonin and N-acetyl 5-hydroxytryptamine showed the strongest cytoprotection. *In vivo* experiment, serotonin and N-acetyl 5-hydroxytryptamine reduced lipid peroxidation in ICR mice given BHP. In these experiments, serotonin and N-acetyl 5-hydroxytryptamine markedly showed the protective effect against ROS-induced stress *in vivo* and *in vitro* experiments.

**Key Words:** Indole derivatives, Reactive oxygen species, Scavenging

### 서 론

최근에 암을 비롯한 여러 질환의 발생 기전에 관여하고 있는 것으로 알려져 있는 활성산소로서는  $\cdot O_2^-$  (superoxide anion radical),  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide) 및  $\cdot OH$  (hydroxyl radical) 등이 있으며, 이들

은 세포내 과립(mitochondria, microsome, peroxisome) 및 cytosol에서 생성된다.<sup>1)</sup> 이러한 활성산소(reactive oxygen species)는 대식세포(macrophage)의 살균작용, 오래된 단백질의 제거 등에 이용되는 필수 불가결한 물질이나,<sup>2)</sup> 반응성이 커서 생체 내에서 유해한 작용을 나타낼 수 있다. 그러므로 활성산소중

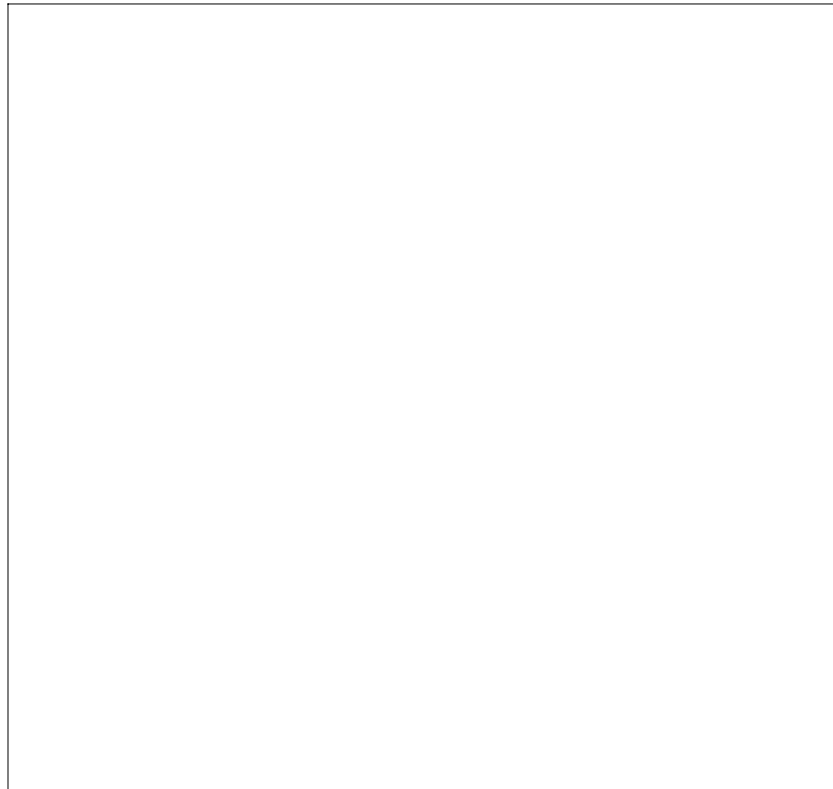


Fig. 1. Structures of indole derivatives.

의 독성에 대한 중요성이 인식되었고, 그것들을 제거할 수 있는 제거제 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Ascorbate, vitamin E, cysteine, cysteamine, L-mercaptoethylamine, butylated hydroxytoluene (BHT), dimethylethanolamine이 주된 항산화물질로 잘 알려져 있다. 또한 이들 약제들은 암 발생을 방지하고, 면역능을 증강시키며, 아밀로이드 형성을 지연시키고, 동맥경화증 등의 노인성 질환의 발생을 억제한다고 한다.<sup>3)</sup> 그리고, 전 연구에서 우리는 천연에 존재하는 항산화제로 녹차 성분들이 활성산소종 그리고  $O_2^-$ 와 NO가 반응해서 형성되어지는 ONOO<sup>-</sup>을 효과적으로 제거한다고 보고했다.<sup>4,5)</sup>

또 한편으로 생체내 물질로서 뇌의 송과선에서 분비되는 인돌 유도체(indole derivatives) 중 하나인 멜라토닌(melatonin)은 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되고 있는 활성산소종들을 제거하여 단백질, 지질, 그리고 DNA을 효과적으로 보호하므로 다양한 생물학적 활성과 약리학적 효과를 가지는 것으로 보고됨에 따라

인돌 유도체들에 관한 연구가 계속되고 있다.<sup>6)</sup> 그러나 인돌 유도체의 일종인 멜라토닌이나 세로토닌에 대한 연구들이 부분적으로 행해지고 있지만 그 이외의 인돌 유도체에 관한 체계적인 연구들은 아직 초기 단계에 있으므로 본 연구에서는 8종의 인돌 유도체들 Tryptophan (TRP), 5-Methoxyindole-3-acetate (MIA), 5-Methoxytryptamine (MT), 5-Hydroxy-D-tryptophan (HDT), 5-Hydroxy-L-tryptophan (HLT), 5-Hydroxytryptamine (Serotonin), N-Acetyl-5-hydroxytryptamine (AHT), N-Acetyl-5-methoxytryptamine (Melatonin) (Fig. 1)에 대해 활성산소종 및 뇌 조직 homogenate에서의 총 활성산소 제거활성에 대한 screening을 실시했다. 그리고 세포배양계에서 인돌 유도체들의 세포 보호작용을 조사하였다. *In vitro* 실험계의 결과들을 토대로 가장 효과가 강한 인돌 유도체, 즉 세로토닌과 AHT를 택하여, 산화적 스트레스를 유도하는 물질인 지질과산화물 *t*-butylhydroperoxide (BHP)을 처리한 후 뇌 조직을 적출하여 그들의 보호작

용을 규명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1) *In vitro* 에서 인돌 유도체들의 활성산소종 제거 효과에 관한 실험

활성산소종들은 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFDA) 방법으로 측정하였다. DCFDA를 99.9%의 에탄올에 용해하여 12.5 mM로 만들고 esterase를 3차 증류수에 용해해서 600 U/ml을 만들어 이들 모두를  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 stock solution으로 저장하였다. 실험시 1 mM DCFDA 30  $\mu\text{l}$ 와 600 U/ml esterase 30  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여  $22^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 배양한 후 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)이 만들어지면 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 2960  $\mu\text{l}$ 를 첨가 사용전까지 암소에서 냉장 보관하였다. 이는 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 되므로, excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 60분간 Fluorescence Microplate Reader (FL 500, Bio-Tex Instruments)로 형광의 변화를 측정하였다.

##### (1) $\cdot\text{O}_2^-$ 에 대한 제거작용 측정

50 mM menadione과 50 mM potassium phosphate buffer를 1 : 34 비율로 pH 7.4되게 섞은 용액 140  $\mu\text{l}$ 에 인돌 유도체 10  $\mu\text{l}$ 를 96 well plate에 넣어  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 진탕시켰다. 여기에 DCFH 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 넣어 생성된  $\cdot\text{O}_2^-$ 와 반응하여 나타내는 형광의 양을 60분간 측정하였다. Menadione은  $\cdot\text{O}_2^-$ 을 발생시키는 물질이다.

##### (2) $\text{H}_2\text{O}_2$ 생성에 대한 제거작용

50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 과 50 mM potassium phosphate buffer를 1 : 34 비율로 pH 7.4되게 섞은 용액 140  $\mu\text{l}$ 에 인돌 유도체 10  $\mu\text{l}$ 를 96 well plate에 넣어  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 진탕하였다. 여기에 DCFH 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 넣어 생성된  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 반응하여 형광의 양을 60분간 측정하였다.

##### (3) $\cdot\text{OH}$ 생성량의 측정

50 mM  $\text{FeSO}_4$ 과 50 mM potassium phosphate

buffer를 1 : 34 비율로 pH 7.4되게 섞은 용액 140  $\mu\text{l}$ 에 인돌 유도체 10  $\mu\text{l}$ 를 96 well plate에 넣어  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 진탕하였다. 여기에 DCFH 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 넣어 생성된  $\cdot\text{OH}$ 와 반응하여 생성된 형광의 양을 60분간 측정하였다.  $\cdot\text{OH}$ 은  $\text{FeSO}_4$ 와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 반응시켜 생성되어진 물질이다.

#### (4) ICR계 수컷 마우스의 뇌조직 homogenate에서 인돌 유도체들의 총 활성산소 제거 효과 측정

뇌 조직의 homogenate의 총 활성산소 생성능을 DCFDA assay를 이용하여 측정하였다. 즉 뇌 조직 homogenate 10  $\mu\text{l}$ 와 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 190  $\mu\text{l}$ 를 순서대로 96 well plate에 넣은 후  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 진탕하였다. 125  $\mu\text{M}$  DCFDA를 50  $\mu\text{l}$  첨가하여 생성된 형광의 변화를 60분간 측정하였다.

#### 2) 세포배양계에서 산화적 스트레스에 대한 5-hydroxyl indole 유도체들의 세포 보호작용에 관한 실험

##### (1) 세포배양

신경생물학적인 연구에 많이 활용되는 PC12와 혈관내피세포인 CPAE(일본 세포 은행: Tokyo, Japan)를 각각 75  $\text{cm}^2$  tissue culture flask (Corning Co., New York, U.S.A.)에  $2 \times 10^6$  cells/ml의 밀도가 되게 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 heat-inactivated ( $56^{\circ}\text{C}$ , 30분) 10% horse serum와 5% fetal calf serum (PC12인 경우) 또는 10% fetal calf serum (CPAE인 경우) 함유하고 여기에 glutamine (5.84 mg/ml), amphotericin B (0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 U/ml)을 첨가하였다. 그리고  $\text{NaHCO}_3$ 을 가하여 pH 7.4 ~ 7.6으로 조절한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: Nissui, Tokyo, Japan)로  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의 조건에서 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

##### (2) 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay<sup>7)</sup>

MTT stock solution은 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)에 MTT가 5 mg/ $\mu\text{l}$ 가 되도록 녹여 암소에서 냉동 보관하였으며, PC12와 CPAE를 각각 48-well plates에 배양하여 배지를 제거하고 D-PBS로 1회 세척한 후 serum free media 450  $\mu\text{l}$ 를 넣는다. 1 mM 5-hydroxyl indole 유도체 4.5  $\mu\text{l}$ 를 가하고 30분

후에 PC12에는 5 mM BHP 4.5  $\mu$ l, CPAE에는 50 mM BHP 4.5  $\mu$ l를 각각 가하여 2시간 배양하였다. 그런 다음 MTT 50  $\mu$ l를 가하고 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 3시간 배양하여 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenases의 환원반응에 의하여 MTT를 formazan products로 변화시킨 후 acidic-isopropanol Triton-X 100 500  $\mu$ l를 각 well에 가하고 생성된 보라색의 결정물질을 완전히 용해시켜 용출되도록 하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) *In vivo*에서 지질과산화에 대한 세로토닌, AHT의 뇌조직 보호작용 실험

(1) 실험동물 및 약물투여

① 실험동물: ICR계 수컷 마우스로 대한 동물 센터 (Taegu, Korea)에서 구입하여 예비 사육한 후 체중이 35 g 전후의 것을 실험에 사용하였다. 이때, 사육실의 온도는 24±1°C, 습도 50%, 명암은 12시간 주기로 조정하였다.

② 약물투여: 각 군의 생쥐를 6마리씩 1군으로 하여 대조군에는 생리식염수를 약물투여군에는 세라토닌, AHT를 각기 10 mg/kg 혹은 50 mg/kg의 농도로 복강 투여하였다. 1시간 후에 대조군 및 약물투여군에 지질과산화를 유도하는 물질인 BHP (120 mg/kg. i.p.)을 복강 주사한 후, 5시간 30분 후에 경동맥을 절개하여 출혈사 시켰다.

(2) 조직분획

뇌조직을 취하여 5 w/v가 되도록, 냉 50 mM

potassium phosphate buffer (pH 7.4, 0.5 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 1 mM EDTA, 80 mg/l trypsin inhibitor 함유)를 가해 균질화 하였다. 900 g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 그 상등액을 다시 12000 g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 homogenate으로 하였다.

(3) 지질과산화에 대한 세로토닌 및 AHT의 효과 측정<sup>8)</sup>

뇌 homogenate 100  $\mu$ l에 assay mixture (1.2% TBA 용액 : 8.1% SDS 용액 : 20% acetic acid = 20 : 4 : 30)를 500  $\mu$ l 가한 후 이 반응 혼합물을 94°C에서 30분간 가열했다. 냉각하여 생성된 thiobarbituric acid-reactive substance에 butanol 원액 300  $\mu$ l를 넣어 malondialdehyde을 추출하였다. 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액의 형광강도를 excitation 파장 530 nm, emission 파장 590 nm에서 측정하였다.

4) 통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 Mean±SEM치로 표시하였고, 각 실험 결과로부터 ANOVA를 구한 후 Student's t-test, two-tailed를 이용하여 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다.

결 과

1) *In vitro*에서 인돌 유도체의 활성산소종 제거 효과



Fig. 2. Dose-response curves of indole derivatives for scavenging  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$  and  $\cdot OH$ . Values are means±SEM of 3 experiments. HDT, 5-hydroxy-D-tryptophan; HLT, 5-hydroxy-L-tryptophan; AHT, N-acetyl-5-hydroxytryptamine.

Table 1. Scavenging effects of indole derivatives on  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , and  $\cdot OH$ 

Compounds (10 $\mu M$ )	Scavenging of $\cdot O_2^-$ (%)	Scavenging of $H_2O_2$ (%)	Scavenging of $\cdot OH$ (%)
Tryptophan (TRP)	-55.1 $\pm$ 9.1	2.6 $\pm$ 0.4	-45.4 $\pm$ 5.6
5-Methoxyindole-3-acetate (MIA)	-204.7 $\pm$ 25.1	-8.1 $\pm$ 4.0	-104.9 $\pm$ 1.4
5-Methoxytryptamine (MT)	-229.1 $\pm$ 25.8	5.6 $\pm$ 3.9	-55.2 $\pm$ 5.7
5-Hydroxy-D-tryptophan (HDT)	74.0 $\pm$ 0.5	36.0 $\pm$ 2.0	36.4 $\pm$ 2.7
5-Hydroxy-L-tryptophan (HLT)	77.5 $\pm$ 2.2	32.2 $\pm$ 4.3	35.9 $\pm$ 1.0
Serotonin	82.5 $\pm$ 0.8	37.8 $\pm$ 2.1	42.1 $\pm$ 17.2
N-Acetyl-5-hydroxytryptamine (AHT)	79.7 $\pm$ 1.5	52.3 $\pm$ 0.2	58.5 $\pm$ 1.9
Melatonin	-723.0 $\pm$ 20.7	-2.5 $\pm$ 1.3	-47.0 $\pm$ 4.6

Values are means $\pm$ SEM of 3 experiments.

### (1) $\cdot O_2^-$ 에 대한 제거작용

인돌 유도체들의  $\cdot O_2^-$ 에 대한 제거작용은 각 성분의 농도를 10  $\mu M$ 로 전 처리한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 HDT, HLT, 세로토닌, AHT는 다른 유도체에 비해  $\cdot O_2^-$ 에 대한 제거작용이 큰 것으로 나타났다. 이 네가지 유도체들을 각각 0.1  $\mu M$ , 1  $\mu M$ , 10  $\mu M$ 의 농도로 전 처리한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 농도에서 HDT의 경우 13.5 $\pm$ 4.3%, 36.1 $\pm$ 1.4%, 74.0 $\pm$ 0.5%, HLT의 경우 11.1 $\pm$ 6.3%, 37.8 $\pm$ 2.5%, 77.5 $\pm$ 2.2%, 세로토닌의 경우 7.6 $\pm$ 1.8%, 39.9 $\pm$ 2.6%, 82.5 $\pm$ 0.8%, AHT의 경우 11.6 $\pm$ 5.9%, 36.4 $\pm$ 2.7%, 79.7 $\pm$ 1.5%로 농도 의존적인 제거작용을 나타내었다.

### (2) $H_2O_2$ 에 대한 제거작용

인돌 유도체들의  $H_2O_2$ 에 대한 제거작용은 각 화합물의 농도를 10  $\mu M$ 로 전 처리한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 HDT, HLT, serotonin, 그리고 AHT는 다른 유도체에 비해  $H_2O_2$ 에 대한 제거작용이 큰 것으로 나타났다. 이 네가지 유도체들은 각각 1  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 100  $\mu M$ 의 농도로 전 처리한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 농도에서 HDT의 경우 25.2 $\pm$ 3.4%, 36.0 $\pm$ 2.0%, 55.3 $\pm$ 2.6%, HLT 경우 16.3 $\pm$ 2.7%, 32.2 $\pm$ 4.3%, 58.1 $\pm$ 3.4%, 세로토닌의 경우 21.7 $\pm$ 1.7%, 37.8 $\pm$ 2.1%, 48.5 $\pm$ 2.4%, AHT의 경우 17.7 $\pm$ 3.1%, 52.3 $\pm$ 0.2%, 65.5 $\pm$ 2.7%로 농도 의존적으로 강력한 제거작용을 나타내었다.

### (3) $\cdot OH$ 에 대한 제거작용

인돌 유도체들의  $\cdot OH$ 에 대한 제거작용은 각 성분의 농도를 10  $\mu M$ 으로 전처리한 결과, Table 1에서 보는

바와 같이 HDT, HLT, serotonin, AHT는 다른 유도체에 비해  $\cdot OH$  생성을 제거하는 작용이 크게 나타내었다. 이 네가지 유도체에 대해 1  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 100  $\mu M$ 의 농도로 전 처리한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 농도에 대해 HDT의 경우 16.5 $\pm$ 2.3%, 36.4 $\pm$ 2.7%, 86.1 $\pm$ 1.2%, HLT의 경우 12.3 $\pm$ 2.5%, 35.9 $\pm$ 1.0%, 71.7 $\pm$ 1.7%로, 세로토닌의 경우 12.4 $\pm$ 4.6%, 57.2 $\pm$ 4.2%, 83.3 $\pm$ 1.0%, AHT의 경우 21.2 $\pm$ 4.4%, 58.5 $\pm$ 1.9%, 75.4 $\pm$ 0.8%로 농도 의존적으로 제거작용을 나타내었다.

### (4) ICR계 수컷 마우스 뇌조직 homogenate에서 각 인돌 유도체의 총 활성산소 제거 효과

인돌 유도체들의 뇌조직 homogenate에서의 총 활성산소 제거작용은 각 유도체들의 농도를 100  $\mu M$ 으로 전 처리한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 세로토닌과 AHT는 다른 유도체들과는 달리 활성산소에 강한 제거능을 보였다.

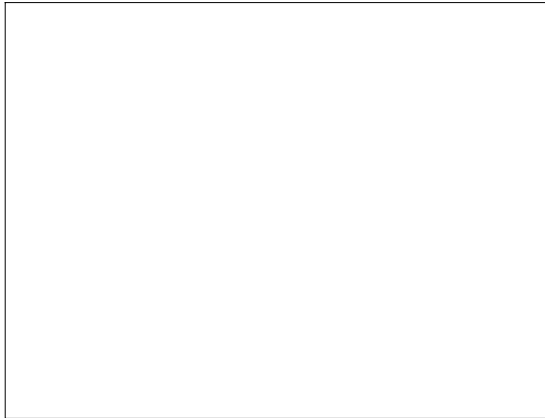
### 2) 세포배양계에서 산화적 스트레스에 대한 5-hydroxyl indole 유도체들의 세포 보호작용

인돌 유도체들 중, Table 1, 2와 Fig. 2에서 유의성 있게 ROS 제거능을 나타낸 hydroxyl 그룹을 가진 인돌 유도체, HDT, HLT, 세로토닌 및 AHT의 BHP에 대한 세포보호작용을 PC12와 CPAE에서 검토하였다. Table 3에서 보는바와 같이 PC12와 CPAE에 대한 세포 보호 효과가 관찰되었으며, 특히 세로토닌과 AHT가 가장 강한 활성을 나타내었다.

**Table 2.** Scavenging effects of indole derivatives on reactive oxygen species in the brain homogenate

Compounds (100 $\mu$ M)	scavenging (%)
Tryptophan (TRP)	0.3 $\pm$ 3.3
5-Methoxyindole-3-acetate (MIA)	-18.4 $\pm$ 2.0
5-Methoxytryptamine (MT)	-13.9 $\pm$ 2.9
5-Hydroxy-D-tryptophan (HDT)	9.1 $\pm$ 2.2
5-Hydroxy-L-tryptophan (HLT)	6.8 $\pm$ 2.2
Serotonin	52.9 $\pm$ 1.3
N-Acetyl-5-hydroxytryptamine (AHT)	42.8 $\pm$ 1.1
Melatonin	-46.5 $\pm$ 1.7

Values are means $\pm$ SEM of 3 experiments.



**Fig. 3.** Effect of serotonin and AHT on brain peroxynitrite level in oxidant challenged mice. The mice were killed 5 hr 30 min after treatment with SIN-1 (100 mg/kg, i.p.) Value are mean $\pm$ SEM of 6 mice. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. SIN-1  
SIN-1, 3-morpholinosydnonimine; AHT, N-acetyl-5-hydroxytryptamine.

**3) *In vivo*에서 지질과산화에 대한 세로토닌 및 AHT의 뇌조직 보호작용**

세로토닌과 AHT는 BHP를 처리한 생쥐에서 지질과산화 형성을 억제하였으며, 특히, BHP를 처리한 생쥐에 50 mg/kg AHT를 첨가되었던 군에서 지질 과산화를 유의성 있게 감소시켰다(\*p<0.05, Fig. 3).

**Table 3.** Cytoprotective effects of 5-hydroxyl indole derivatives against BHP in cultured PC12 and CPAE cell

Compounds (10 $\mu$ M)	Cell viability (%)	
	PC12	CPAE
BHP	64.4 $\pm$ 2.0	62.0 $\pm$ 2.3
HDT+BHP	72.9 $\pm$ 2.3**	73.1 $\pm$ 1.5**
HLT+BHP	76.7 $\pm$ 3.8**	72.4 $\pm$ 0.6**
Serotonin+BHP	86.7 $\pm$ 1.0***	84.5 $\pm$ 1.7***
AHT+BHP	82.1 $\pm$ 3.4**	80.9 $\pm$ 0.5***

The cells were pretreated with 5-hydroxyl indole derivatives for 30 min and then were exposed to 50  $\mu$ M (PC12) or 500  $\mu$ M (CPAE) of BHP for 2 hrs.

Values are means $\pm$ SEM of 3 samples.

Statistical significance: \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. BHP only.

BHP, t-butyl hydroperoxide; SIN-1, 3-morpholinosydnonimine; HLT, 5-hydroxy-L-tryptophan; HDT, 5-hydroxy-D-tryptophan; AHT, N-acetyl-5-hydroxytryptamine.

**고 찰**

5번 위치에 hydroxyl기를 가진 인돌 유도체들이 항산화작용을 가지고 있다는 것이 계속 보고되고 있다. 이와 관련된 몇몇 연구보고들로는 해마, 연수, 뇌교, 중뇌, 피질, 그리고 선조체 등의 모든 부위에서 존재하는 세로토닌은  $\cdot O_2^-$ ,  $\cdot OH$ , 그리고 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals를 제거하고 지질과산화를 감소시킨다고 알려져 있다.<sup>9-11)</sup> 그 이외에도 5-hydroxyindole-3-acetate (HIA)은 활성산소종에 의해 유도되는 deoxyribose와 지질과산화를 농도 의존적으로 억제한다는 것이 알려져 있으며, AHT는 2, 2'-azobis(2-amidinopropane)에 의해 유도되었던 리놀레산(linoleic acid)의 지질 과산화를 막았고 HLT가 지질과산화를 억제한다고 보고되어 있다.<sup>12,13)</sup> 최근 우리의 전 연구에서 세로토닌이 xanthine/xanthine oxidase 계에서 발생하는  $\cdot O_2^-$ 을 효과적으로 제거하는 것을 밝혔다.<sup>14)</sup> 본 실험에서도 5번 위치에 hydroxyl기를 가진 인돌 유도체들이  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ , 그리고 뇌조직 homogenate에서 발생하는 활성산소에 대한 실험에서 효과적인 제거 작용을 보였다. 그리고 *In vitro*에서 효과가 뛰어난 5번 위치에 hydroxyl기를 가진 인돌 유도체들이 BHP 독성에 대해 PC12와 CPAE 세포보호작용을 나타내었으며, 특히 세로토닌과 AHT가 강한 활성을

나타내었다. *In vitro*에서 강한 활성산소 제거능을 나타낸 세로토닌 및 AHT가 과산화물의 일종인 BHP을 투여한 생쥐의 뇌에서 지질과산화물을 억제하였다.

인돌 유도체들이 항산화작용을 가질 수 있는 것은 두 가지 기전으로 설명하고 있다. 첫째는 hydroxyl group을 가지고 있는 인돌 유도체들이 전형적인 chain-breaking 항산화제로 작용해서 지질과산화물을 억제하는 것이고,<sup>9)</sup> 둘째는 인돌 구조를 기본으로 가지고 있는 유도체들이 전자친화성이 있는 화합물에 전자를 줌으로써 항산화작용을 가지게 되는 것이다. 즉, 인돌 유도체들은 전자를 주고 자신은 pyrrol ring에 안정된 indolyl radicals를 형성해서 부분적으로 자신은 산화가 된다. 이것은 즉시  $\cdot O_2^-$  존재 하에서 급격하게 kynuramine 전환 대사 과정을 거치는 동안 효과적으로 산화작용을 억제한다고 제시하고 있다.<sup>15,16)</sup> 따라서, 본 실험에서는 hydroxyl group을 가지고 있는 인돌 유도체들이 다른 group을 가진 인돌 유도체들보다 높은 활성산소 제거능을 보여주었다. 항산화 물질로 잘 알려진 멜라토닌이 본 실험에서는 큰 효과를 나타내지 못했다. 이것은 인돌 유도체들이 항산화제로 작용할 때는 hydroxyl기를 가지고 있는 것이 크게 공헌할 것으로 여겨진다. 그리고 이것은 다른 연구 결과들과도 일치했다.<sup>9,10)</sup>

방향족 아미노산인 TRP은 세로토닌 뉴런의 세포질에서만 발견되는 L-tryptophan hydroxylase에 의해 HLT으로 전환된다. HLT는 비특이적 효소인 L-aromatic amino acid decarboxylase에 의해 세포질에서 세로토닌으로 탈탄산화 된다. 세로토닌은 indoleamine N-acetyltransferase와 hydroxyindole O-methyltransferase에 의해 각각 AHT과 MT로 전환되고, 같은 효소들에 의해 이것들은 멜라토닌을 만든다. 멜라토닌은 monoamine oxidase에 의해 5-methoxyindole acetaldehyde로 전환되고, 이것은 다시 aldehyde dehydrogenase에 의해 MIA를 형성한다.<sup>17-19)</sup> 따라서 인체 내에서 생성되어지는 인돌 유도체들은 신경전달물질로서의 기능뿐만 아니라 활성산소 제거제의 역할을 수행할 것으로 여겨진다.

따라서 세로토닌과 AHT는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 활성산소에 대한 보호작용을 나타내는데, 이것은 세로토닌과 AHT가 활성 산소 스트레스에서는 지질과산화의 억제에 기인한 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단(KOSEF 97-04-02-7-1-3)의 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사드립니다.

## 참고 문헌

- 1) Corfran RS, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. W.B. Saunders, Philadelphia, 1989; pp 1.
- 2) Oyanagui Y. SOD and active oxygen modulators. Nihon Igakukan, Tokyo, 1989; pp 17.
- 3) Koo A. Microvascular techniques for *in vivo* assay of vasoactive agents from Chinese medicinal herbs. *Advances in Chinese medicinal materials research*. World Scientific Publ Co., Singapore, 1985; pp 559.
- 4) Yokozawa T, Dong E, Nakagawa T, Kashiwagi H, Nakagawa H, Takeuch S, Chung HY. *In vitro* and *in vivo* studies on the radical-scavenging activity of tea. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 2143-2150.
- 5) Chung HY, Yokazawa T, Soung DY, Kye IS, No JK, Baek BS. Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4484-4486.
- 6) Reiter RJ, Robinson J. Melatonin: Your body's natural wonder drug. Tae-Il Publishing Co. 1995.
- 7) Tim M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method* 1983; 65: 55-63.
- 8) Laganriere S, Yu BP. Antilipoperoxidation action of food restriction. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145: 1185-1191.
- 9) Marshall K, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin *in vitro*. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 307-315.
- 10) Daniels WMU, van Rensburg SJ, van Zyl JM, van der Walt BJ, Taljaard JJF. Free radical scavenging effects of melatonin and serotonin: possible mechanism. *NeuroReport* 1996; 7: 1593-1596.
- 11) Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 1998; 3: 135-174.
- 12) Liu J, Mori A. Monoamine metabolism provides an antioxidant defense in the brain against oxidant- and free radical-induced damage. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 118-127.
- 13) Longoni B, Pryor WA, Marchiafava P. Inhibition of

- lipid peroxidation by N-acetylserotonin and its role in retinal physiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 778-780.
- 14) Soung DY, Chung HY, Yokozawa T. A novel action of 5-hydroxytryptamine as a peroxynitrite scavenger. *Pham Pharmacol Commun* 1998; 4: 583-586.
  - 15) Pierrefiche G, Topall G, Henriet CI, Laborit H. Anti-oxidant activity of melatonin in mice. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1993; 80: 211-223.
  - 16) Poeggeler B, Saarela S, Rieter RJ, Tan D, Chen L, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin - A highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 17: 419-420.
  - 17) Birdsall TC 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. *Altern Med Rev* 1998; 3: 271- 280.
  - 18) Miller JW, Selhub J, Joseph JA. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radic Med Biol* 1996; 21: 241-249.
  - 19) Li P, Pang SF, Tsang CW. Retinal 5-methoxytryptamine and 5-methoxyindole-3-acetic acid in the rat and quail: diurnal rhythms and interspecies differences. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 353- 356.