

## 옻나무 에탄올 추출물의 쥐 뇌세포에 대한 항산화효과

임계택 · 심재한\*

전남대학교 생물공학연구소, \*전남대학교 농화학과

### Antioxidative Effects of Ethanol Extracts from *Rhus Verniciflua Stokes* (RVS) on Mouse Whole Brain Cells

Kye-Taek Lim and Jae-Han Shim\*

Institute of Biotechnology, Chonnam National University

\*Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University

#### Abstract

To measure antioxidative activities, the various extracts from RVS (*Rhus Verniciflua Stokes*) were tried out with either DPPH or thiocyanate method. Also we used the GO (Glucose Oxidase) 20 mU/mL hydroxyl radical system in mouse whole brain cell culture. Chloroform, n-hexane or ethanol were used as extract solutions which had different polarity respectively. In DPPH and thiocyanate method, the antioxidative activities of the crude ethanol extracts were stronger than other extracts. The crude ethanol extracts were fractionated 5 peaks by glass column. Among of them, antioxidative activity of peak II ( $P_{II}$ ) was shown stronger than other fractions, a little for peak III ( $P_{III}$ ) and peak IV ( $P_{IV}$ ), and none for peak I ( $P_I$ ) and Peak V ( $P_V$ ). In the antioxidative effects of crude ethanol extracts (30 mg/mL), cell viabilities were evaluated 1  $\mu$ L (297  $\mu$ g/mL), 2  $\mu$ L (588  $\mu$ g/mL) of crude ethanol extracts 59%, 68% respectively. 10  $\mu$ L (2,727  $\mu$ g/mL) addition of crude ethanol extracts had 95% cell viabilities, 0.01% significant, comparing control. In addition, the compounds related to antioxidative effect of crude ethanol extract might be glycoproteins by means of SDS-PAGE. Comparison to antioxidative effects between several antioxidants (ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, catalase), 273  $\mu$ L/mL addition of crude ethanol extracts corresponds to 1  $\mu$ g/mL catalase in antioxidative effects.

Key words: antioxidant, RVS extract, mouse whole brain cell

## 서 론

산업발달, 식생활의 변화, 환경오염원들은 인간에게 질병을 일으키는 원인으로 알려져 있지만, 그 중에서도 대사과정중 과다한 oxygen free radical의 생성은 세포지방막과 단백질의 산화, DNA의 산화내지는 돌연변이를 유발시키는 주 요인으로 알려져 있다<sup>(1-3)</sup>.

다른 한편 oxygen free radical은 생체내에서 신호전달물질 및 면역체계를 비롯한 정상적인 생명현상에도 관여한다고 알려졌다<sup>(4)</sup>. 이러한 oxygen free radical에는  $O_2^{\cdot-}$  (superoxide anion),  $\cdot OH$  (hydroxyl radical),  $RO_2^{\cdot}$  (peroxyl radical),  $RO\cdot$  (alkoxyl radical) 등이 있으며 active oxygen으로서는  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide), HOCl

등이 있다. 하지만 일반적으로 생명체에는 catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione, heat shock proteins, selenium, metallothioneins, superoxide dismutase, ascorbic acid, A-tocopherol, vitamin A 등이 있어 어느 일정수준 이하의 radical에 의한 산화적 스트레스는 생명현상에 큰 문제가 되지 않는다<sup>(6,7)</sup>. 그러나 비 정상적인 대사나 물리, 화학적인 외부자극에 의한 심한 산화적 스트레스는 산화-항산화의 불균형을 야기시켜, 결국에는 대사장애 및 각종 질병의 유발과 더불어 DNA변성, 세포막 지방의 산화, 단백질의 산화 및 변성등을 초래하여 세포의 기능을 방해하고 결과적으로는 세포를 죽게 한다<sup>(8,9)</sup>.

이와같은 항산화제의 중요성 때문에 많은 학자들은 오래전부터 폐놀계, 아민계, 설파이드계의 합성항산화제를 개발해왔지만 이들의 안정성과 유해성 여부에 대해선 아직도 논란의 대상이 되고 있다. 특히 폐놀계

Corresponding author: Kye-Taek Lim, Institute of Biotechnology, Chonnam National University, 300 Yonghong-dong, Kwangju 500-757, Korea

중 합성항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) 등은 단용 또는 혼용으로 일정수준 이상 섭취시 심각한 여러질환을 유발시킬 수 있는 것으로 알려졌다<sup>(10,11)</sup>. 또한 합성항산화제는 이취가 있고 고온에서 불안정하며<sup>(12,13)</sup>, 기형발생인자 및 발암물질이 될 수 있고<sup>(14)</sup>, 특히 합성항산화제의 과용은 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성작용을 일으키는 것으로도 알려졌다<sup>(15)</sup>. 따라서 생체 부작용이 없고 항산화력이 강한 천연항산화제를 동, 식물로부터 찾으려는 많은 연구들이 진행되고 있다<sup>(16-18)</sup>.

율나무는 생리활성물질의 약리적 가치 때문에 우리 선조들은 한방에서 내종의 치료제로써 사용해왔으며<sup>(19,20)</sup>, 일상생활에서는 가구의 장식과 보존을 위해 도료 또는 방부제로써 사용해왔다. 따라서 율나무에는 생리활성물질과 산화를 억제해주는 물질이 존재한다는 것을 간접적으로 시사해주고 있다. 즉 율나무는 oxygen free radical에 원인하는 세포막 지방의 산화, 단백질의 산화 등을 억제할 수 있다는 간접적인 의미를 포함하고 있다. 그러나 율나무 생리활성물질의 어떤 화학적 성분이 항산화력을 가지고 있는지, 그 활력이 어느정도인지에 대하여 연구한 결과는 아직 보고되어 있지 않다.

따라서 본 연구는 극성이 각각 다른 용매로 율나무에서 추출된 물질의 항산화성 유무를 등을 생쥐 뇌세포를 배양하여 비교했다.

## 재료 및 방법

### 재료

율나무는 전남 영암군 서호면에서 자생한 것을 95년 10월에 채취하여 본 실험에 시료로 사용하였다. 쥐의 품종은 ICR 이었고 사육조건은 Lee 등(1996)의 방법에 따랐다<sup>(21)</sup>.

### 시약

Ethanol, chloroform, n-Hexane, silica gel, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazolium bromide, (MTT), linoleic acid, ammonium thiocyanate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferrous chloride, minimum essential medium (MEM) 등은 미국Sigma사로부터 구입하였다.

### 시료제조

시료로 채취한 율나무 가지를 대략 5 cm정도로 세절하여 1 kg씩 불투명한 병에 극성이 다른 용매(ethanol, chloroform, n-hexane; 각각 10 L)와 함께 넣어 지하 압

실에 6개월간 침지시킨 후 불순물을 제거하기 위해 Whatman 여과지(No. 2)로 여과한 다음 회전농축기에 서 감압 농축하여 건조시킨 후 시료로 사용하였다.

### 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)에 의한 항산화력 Screening

극성이 다른 용매로 율나무에서 추출 건조된 시료의 항산화력 유무를 탐색하기 위해 추출물을 일정농도(30 mg/mL)로서 70% 에탄올로 희석한 후 Tomohiro 등(1994)<sup>(22)</sup>과 Mosmann (1983)<sup>(23)</sup> 등의 방법에 따라 screening 하였다. 즉, Whatman 여과지를 대략 지름이 2 cm 크기로 절단, 멸균하여 건조시킨 후 용매의 추출물을 200 µL 분무하고 건조시킨 후 그 위에 DPPH용액 200 µL (80 µg/mL in EtOH)를 분무하여 건조시켰다. 10분 경과한 후 발색에 의하여 항산화력을 측정했다.

### Thiocyanate에 의한 항산화력 측정

Thiocyanate에 의한 항산화력은 Takao 등(1994)<sup>(22,23)</sup>의 방법을 이용했다. 먼저 linoleic acid (25 mg/mL in EtOH), ferrous chloride (2.45 mg/mL in 3.5% hydrochloric acid), ammonium thiocyanate (0.3 g/mL in H<sub>2</sub>O), phosphate buffer (pH 7.0)를 제조하여 이를 stock solution으로 사용하였다. 혼합용액은 각 sample 용액(율나무 추출물) 200 µL, linoleic acid 200 µL을 시험관(1.5 × 4.3 cm)에 넣고 섞은 후 phosphate buffer 400 µL와 증류수 200 µL를 혼합하여 40°C에서 은박포장한 후 보관하였다. 혼합용액에서 100 µL를 취하여 colorimetric tube에 넣고 ethanol(70%) 3 mL 와 ammonium thiocyanate 용액 100 µL, ferrous chloride 용액 100 µL를 혼합한 후 3분 뒤에 500 nm에서 spectrophotometer (LKB)로 흡광도를 측정했다.

### 분획

율나무 에탄올 추출물(조 에탄올 추출물)의 분획은 glass column [4 cm × 18 cm, silica gel, 28~200 mesh, 22 Å, Sigma, Inc. CO., LTD.]을 이용하여 70% 에탄올 용매로 100 drops (= 4 mL)씩 분획하였다.

### SDS-PAGE

Lee (1996) 등의 방법에 따라 0.1% SDS 및 polyacrylamide 18% gel에서 수행 하였다<sup>(21)</sup>. 율나무로부터 극성이 각각 다른 chloroform, ethanol, n-hexane로 건조된 추출물을 증류수로 각각 30 mg/mL씩 희석하여 0.1% SDS로 95°C에서 10분간 변성시킨 후 loading buffer에 10 µLL, 20 µLL씩 sample을 취하여 전기영

동한 후 coomassie brilliant blue R-250로 염색하였다.

쥐 뇌세포 배양

쥐 뇌세포 배양은 Lim 등(1995)의 방법에 따라 수행했다(24,25). 즉, 임신 13일째인 ICR 생쥐를 경추분리하여 embryo에서 뇌를 절취한 후 인산완충용액(phosphate buffered saline; PBS, pH 7.2)으로 씻고 현미경하에서 수술용 칼로서 잘게 세절했다. 세절된 뇌세포 조직을 15 mL 시험관에 0.25% trypsin과 20 µg/mL DNase를 혼합하여 37°C에서 15분간 배양하고 원심분리(1,000×g)후 상층에 남아있는 trypsin과 DNase을 제거했다. 남아있는 뇌세포 조직을 10 mL 인산완충용액(pH 7.2)를 가하여 재부유시킨 다음 다시 원심분리(800×g)하여 상층액을 버리고 단일세포(single cell)로 만들었다. 단일세포를 현미경하에서 확인한 후 5% fetal bovine serum (FBS)을 함유한 MEM 배지를 사용하여 96 multiwell에 대략 10<sup>5</sup> cells/mL로 균일하게 분주한 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 2일간 배양하였다. 배양 3일째 기존의 배지(old media)를 제거하고 FBS가 포함되어 있지 않은 MEM 배지를 첨가하여 10일간 배양하였다. 이 때 각 well의 MEM 배지최종 부피는 100 µL 이었다.

욱나무 에탄올 추출물의 항산화 효과

쥐 뇌세포를 10일간 배양한 후 Lim 등 (1995)<sup>(25)</sup>의 방법(glucose oxidase system)에 따라 배양액에 0.5% D glucose를 첨가한 후 glucose oxidase (GO) 20 mU/mL와 윷나무 에탄올 추출물(에탄올 조 추출물, 30 mg/mL)을 첨가하여 37°C에서 4시간 배양했다. 이 때 각 well의 배지 량은 100 µL이었다. 4시간 배양 후 각각의 well에 50 µL (5 mg/mL) 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazolium bromide (MTT)를 첨가하여 다시 4시간 배양한 다음 old media을 제거하고, 70 µL의 isopropanol을 첨가하여 10분정도 가볍게 흔들어 microelisa reader (Molecular Devices Corp. Tmax)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포수를 대조구에 대하여 percentage (%)로 환산하였다.

결과 및 고찰

추출용매에 따른 항산화력 측정

욱나무 추출물의 쥐 뇌세포에 대한 항산화 효과를 규명하기 위해 각각 극성이 다른 용매로 추출-건조된 시료(30 mg/mL)를 사용하여 항산화력을 측정된 결과는 아래와 같다. 윷나무 추출에 사용했던 용매는 에탄

올, chloroform, n-hexane 이었고 각각의 추출물은 여러가지 방법을 통해 항산화력을 측정하는데 시료로 사용했다.

먼저 DPPH에 의한 항산화력에 대한 측정은, 생성되는 radical에 의한 발색의(진한 자주색일수록 높은 항산화력)정도로 항산화력의 유무를 판단했다. 각각의 추출 용매에 따른 발색의 변화를 본 결과, 극성이 큰 에탄올 추출물이 강한 자주색(white-on-purple spot)을 나타냈다. 반면 chloroform이나 n-hexane의 추출물은 filter paper색의 변화가 약간 있었지만 에탄올 추출물에 비해 그 정도가 경미했다. 일반적으로 추출 용매와 항산화력과의 상관관계에 있어서 보여준 경향은 극성이 큰 용매 추출물이 비극성 추출물 보다 강한 항산화력을 나타냈다(결과 생략).

Thiocyanate에 의한 항산화력 측정

Thiocyanate 방법에 의한 항산화력의 결과는 에탄올로 추출된 성분이 다른 용매로 추출한 것에 비해 역시 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 1). Fig. 1에서 보는바와 같이 윷나무 에탄올 추출물과 chloroform 추출물간의 항산화력을 비교할 때 에탄올 추출물이 다른 용매로 추출한 것에 비해 보다 높은 항산화력을 가지는 것으로 나타났으며, 또한 에탄올 추출물은 catalase 및 α-tocopherol과 항산화력가를 비교했을 때도 상당한 항산화력을 보여주었다(Fig. 6). 이와같은 결과는 탈지질 깨박과 패모, 어성초 등에서 극성이 다른 여러 용매로 추출하여 그에 따른 항산화력을 측정된 결과 극성이 큰 에탄올 추출물이 chloroform이나 hexane과 같은 비극성 용매보다는 항산화력이 보다 높다는 윤 석권 등(1993)<sup>(26)</sup>과 이 연재 등(1993)<sup>(27)</sup>의 결과와 동일한 경향

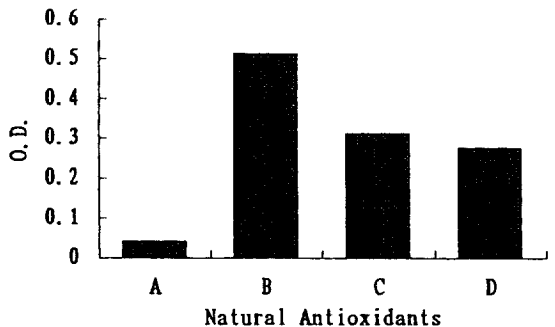


Fig. 1. Antioxidative activities of extracts from Rhus Verniciflua Stokes (RVS) by thiocyanate method. Antioxidative activity measured at 500 nm. A: 50 µM Ascorbic acid, B: 10 µg/mL Catalase, C: 200 µL extracts with ethanol from RVS, D: 200 µL extracts with chloroform from RVS.

을 보여준다. 따라서 본 실험에서는 율나무에서 70% 에탄올로 추출한 성분을 쥐 뇌세포에 대한 항산화력 측정에 사용했으며, 특별한 설명이 없는 한 율나무 에탄올 추출물은 조 에탄올 추출물을 의미한다.

에탄올 추출물의 항산화력

에탄올 추출물을 glass column (silica gel)으로 분획하여 5개의 peak를 얻었다(Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이 5개의 peak 중 두 번째 peak의 흡광도가 가장 컸고, peak I (P<sub>I</sub>)의 경우는 여러성분들이 완전히 분리되지 않아 3개의 shoulder를 보였다. 분리된 8개 peak에 대한 각 항산화력을 thiocyanate 방법으로 그 활성을 측정하고 결과 peak II 분획이 다른 분획에 비해 항산화력이 가장 높은 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 분획 III (P<sub>III</sub>)와 분획 IV (P<sub>IV</sub>)도 어느정도의 항산화력을 나타냈지만 P II에는 미치지 못했으며, 분획 I과 분획 V (P<sub>V</sub>)는 항산화력이 거의 없었다. 따라서 율나무에서 항산화 성분을 추출하는 유용한 용매는 극성이 큰 에탄올을 이용한 것이 항산화력이 강한 것을 알 수 있었으

며, Column을 이용한 분획물 중 P<sub>II</sub>가 다른 peaks에 비해 항산화력이 강한 것을 볼 수 있었다.

에탄올 추출물의 SDS-PAGE 분석

에탄올 추출물의 항산화 효과에 관여 하는 원인물질의 대략적인 특성을 확인하기 위하여 Lee (1996) 등의 방법에 따라 0.1% SDS 및 polyacrylamide 18% gel에서 전기영동을 수행 하였다(Fig. 4)<sup>(21)</sup>. Fig. 4에서 보는 바와 같이 율나무로부터 극성이 각각 다른 chloroform, ethanol, n-hexane의 추출물 30 mg/mL을 stock solution으로 하여 각각 0.1% SDS로 95°C에서 10분간 변성시킨 후 loading buffer에 10 µL, 20 µL씩 sample을 취하여 전기영동한 후 coomassie brilliant blue R-250로 염색한 결과로서, chloroform이나 n-hexane 추출물에는 band가 없었으나 조 에탄올 추출물(30 mg/mL)에 있어서는 90 KDa 크기에서 하나의 큰 band를 발견할 수 있었다. 한편, Kensuke 등(1996)에 의하면 *Rhus vernicifera*에 함유된 성분들은 대략 60~65%의 페놀계, 5~7%의 rubber-like materials, 3~5%의 질소함유 화합물, 20~30%의 물로 구성되어 있으며, *Rhus vernicifera*의 총 추출물은 실온에서 acetone으로 용해했을 때 그 중 10% 성분만이 녹지 않는 성격을 가지고 있는데 그 것은 질소 함유 화합물이다<sup>(29)</sup>. 아울러 Yarovolov 등(1994)의 보고에 의하면 율나무에는 적은 양이지만 당단백질이 함유되었고, 그 분자량은 대략 140 KDa으로 알려졌다<sup>(28)</sup>. 이와같은 여러결과를 종합

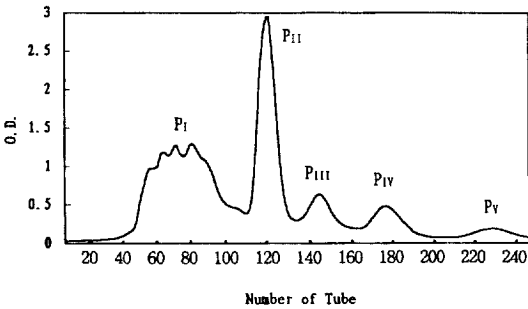


Fig. 2. Column chromatogram of the 70% ethanol extracts from RVS. Silica gel (4 cm×18 cm, 28~200 mesh, 22 Å, Sigma) was used for fractionation, at 254 nm. The eluates were collected 100 drops in each tube. P<sub>I</sub>: peak I, P<sub>II</sub>: peak II, P<sub>III</sub>: peak III, P<sub>IV</sub>, P<sub>V</sub>: peak V.

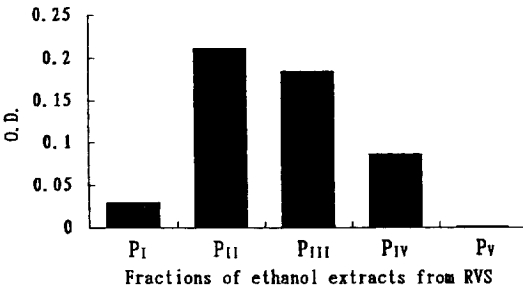


Fig. 3. Comparison to antioxidative activities between each peaks with thiocyanate method, at 500 nm. P<sub>I</sub>: peak, I, P<sub>II</sub>: peak II, P<sub>III</sub>: peak III, P<sub>IV</sub>, P<sub>V</sub>: peak V.

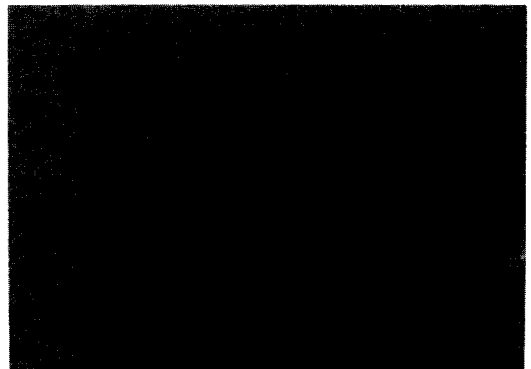


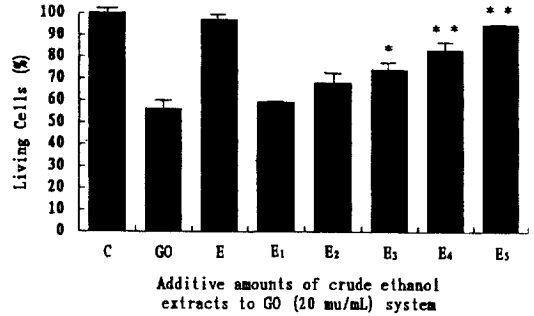
Fig. 4. SDS-PAGE analysis of crude ethanol extract from RVS. Electrophoresis was carried out under the conditions of 18% acrylamide gel, 0.1% SDS and then the gel was stained with coomassie brilliant blue. ▶: indicates 90 KDa protein of crude ethanol extract. MW: Molecular weight, lane 1: 10 uL crude ethanol extract, lane 5: 20 mL crude ethanol extract, lane 6: 10 uL n-hexane extract, lane 7: 20 uL n-hexane extract. The concentration of crude extract was 30 mg/mL.

해 보면, 질소가 함유되었고, 당단백질이라는 화합물은 바로 극성이 낮은 acetone에서 녹지 않지만 극성이 보다 큰 에탄올에는 용해되어 추출될 수 있는 물질이며, 본실험의 SDS-PAGE 결과 강한 하나의 band가 대략 90 KDa의 분자량을 가져 다른 화합물 이라기 보다는 당단백질일 가능성이 큰 것으로 추측된다.

**에탄올 추출물의 항산화 효과**

지금까지의 상용적 방법을 이용한 항산화력 측정 결과를 기초로 oxygen radical에 아주 민감한 쥐 뇌세포를 배양하여 hydroxyl radical generation system<sup>(24,25)</sup>으로 에탄올 추출물의 항산화 효과를 측정하였다. 일반적으로 알려진 hydroxy radicals의 생성기전은, D-glucose와 glucose oxidase의 반응에 의해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 생성되고 이것은 다시 Haber-Weiss reaction<sup>(30)</sup>에 의해 ·OH (hydroxyl radical)이 생성된다. 에탄올 추출물의 항산화 효과는 hydroxy radical에 에탄올 추출물을 30 mg/mL로 희석하여 사용하였고, 이 때 GO의 농도와 배양 시간은 Lim (1995) 등의 방법에 따랐으며, GO의 농도가 20 mU/mL이고 배양시간이 4시간일 때 살아있는 쥐 뇌세포 수는 약 50%라고 보고되었다<sup>(24,25)</sup>.

항산화 효과를 비교하는데 있어 살아있는 세포수는 MTT처리 후 대조구에 대해 %로 계산하였다. 항산화 효과에 있어서 GO 20 mU/mL 처리구는 대조구에 비해 처리 후 4시간에 약 56%의 뇌세포가 살아있는 것을 볼 수 있었으며, GO 20 mU/mL가 처리 후 쥐 뇌세포에 조 에탄올 추출물(30 mg/mL)을 stock solution으로 하여 총 세포배양액 100 µL/well에 1 µL (297 µg/mL), 2 µL (600 µg/mL) 첨가시 뇌세포 생존율은 대조구에 비해 59%, 68% 였다. 또한 4 µL (1,154 µg/mL), 7 µL (1,963 µg/mL)에서는 각각 74%, 83%이었고 10 µL (2,727 µg/mL) 첨가시엔 95%로서 매우 높은 생존율을 보였다(Fig. 5). 본 실험에서 사용된 1 µL의 에탄올 추출물의 농도는 배지의 총량(100 µL)에 대하여 1%에 해당하며, 이 때 에탄올 추출물의 농도는 297 µg/mL이고 에탄올 추출물의 첨가는 10 µL로 제한하였다. 덧붙여 serum은 antioxidant로 알려져 있기 때문에 hydroxy radical에 대한 serum의 영향을 최대한 배제하기 위해 쥐 뇌세포 배양 3일 부터는 serum이 없는 MEM을 사용하였다. 한편 GO 20 mU/mL 첨가없이 10 µL (2,727 µg/mL) 에탄올 추출물만을 배양세포에 첨가시 97%의 생존율을 보였으며, 순수한 70% 에탄올 10 µL (7% 에탄올에 상당) 첨가시 쥐 뇌세포 생존율은 96% 였다. 이 의미는 조 에탄올 추출물 또는 에탄올을 배지 총량에 대하여 7%까지 첨가하여도 쥐 뇌



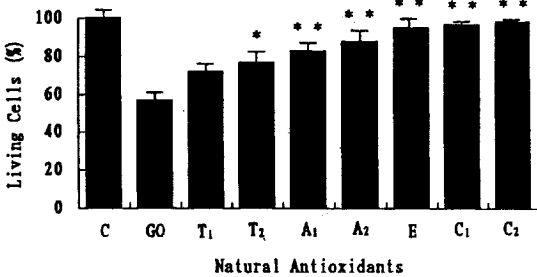
**Fig. 5. Antioxidative effects of crude ethanol extracts (30 mg/mL) from RVS to hydroxyl radical.** Mouse whole brain cells were exposed to hydroxyl radicals generated by 20 mU/mL glucose oxidase (GO) for 4 hr. Cell viability was determined by MTT assay. C: control, GO: 20 mU/mL glucose oxidase, E: 5 µL crude ethanol extract, E<sub>1</sub>: 1 µL (297 µg/mL) crude ethanol extract+GO 20 mU/mL, E<sub>2</sub>: 2µL (588 µg/mL) crude ethanol extract+GO 20 mU/mL, E<sub>3</sub>: 4 µL (1,154 µg/mL) crude ethanol extract+GO 20 mU/mL, E<sub>4</sub>: 7 µL (1,963 µg/mL) crude ethanol extract+GO 20 mU/mL, E<sub>5</sub>: 10 µL (2,727 µg/mL) crude ethanol extract+GO 20 mU/mL. \*P≤0.05, \*\*P≤0.01, significantly differ from the cultures exposed to GO alone, single factor ANOVA analysis.

세포 생존율에 대해 큰 영향을 주지 않는다는 것이다.

Fig. 5는 쥐 뇌세포에 조 에탄올 추출물(30 mg/mL)의 첨가에 따른 항산화 효과를 MTT 방법으로 알아본 결과이며, 조 에탄올 추출물 4 µL (1,154 µg/mL)첨가시 항산화 효과는 P≤0.05 수준에서 유의성을 보여주었다.

**항산화 효과 비교**

Fig. 6는 조 에탄올 추출물의 항산화효과를 GO 20 mU/mL, 4시간 배양하여 잘 알려진 천연항산화제와 비교한 결과이다. 항산화제의 농도 50 µM, 100 µM ascorbic acid; 50 µM, 100 µM α-tocopherol; 10 µg/mL, 20 µg/mL catalase를 넣어 hydroxy radical에 대한 항산화 효과를 측정된 결과 GO 20 mU/mL 만을 처리한 구에 있어서 쥐 뇌세포 생존율이 56% 이었지만 50 µM, 100 µM ascorbic acid에서는 83%, 88%, 50 µM, 100 µM α-tocopherol에서는 각각 72%, 77% 였으며, 10 µg/mL, 20 µg/mL catalase 첨가시 각각 98%, 99% 였다(Fig. 6). 이것은 쥐 뇌세포 95% 이상의 생존율을 가진 에탄올 추출물 10 µL (2,727 µg/mL)는, 10 µg/mL의 catalase 항산화 효과와 상응되며, 100 µM의 ascorbic acid 보다는 약간 강한 항산화 효과를 가진 것을 보여준다. 따라서 에탄올 추출물의 항산화 효과를 catalase와 비교해 볼 때 대략 272배의 항산화력에 대한



**Fig. 6. Comparison to antioxidative effects between crude ethanol extracts from RVS and hydroxyl radical.** Mouse whole brain cells exposed to hydroxyl radicals generated by 20 mU/mL glucose oxidase (GO) and then added different antioxidants separately, for 4 hr. Cell viability was determined by MTT assay. C: control, GO: 20 mU/mL glucose oxidase, T<sub>1</sub>: 50 uM  $\alpha$ -tocopherol+GO 20 mU/mL, T<sub>2</sub>: 100 uL  $\alpha$ -tocopherol+GO 20 mU/mL, A<sub>1</sub>: 50 uM ascorbic acid+GO 20 mU/mL, A<sub>2</sub>: 100 uM ascorbic acid+GO 20 mU/mL, E: 2,727  $\mu$ g/mL of crude extracts, C<sub>1</sub>: 10  $\mu$ g/mL catalase+GO 20 mU/mL, C<sub>2</sub>: 20  $\mu$ g/mL catalase+GO 20 mU/mL. The results are mean  $\pm$  SEM (n=5). \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.01, significantly differ from the cultures exposed to GO alone, single factor ANOVA analysis.

차이가 보였으며, 그 이유는 hydroxy radical을 바로 물로 전환시키는 catalase와는 다른 mechanism이거나, 항산화에 관여하는 원인물질의 화학적 조성이 다르기 때문인 것으로 추측된다. 한편  $\alpha$ -tocopherol의 낮은 항산화 효과는 아마도 지용성인 비타민이기에 녹이는 용매에 따라 그 역가가 다르기 때문인 것으로 보여지며, 상용적으로  $\alpha$ -tocopherol은 멸균된 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하지만 DMSO 그 자체는 세포독성을 가지고 있어 본 실험에서는 에탄올로 용해시키는데 따른 결과로 추측된다.

지금까지의 연구결과를 종합해볼 때, 추출하는 용매에 따라 항산화 효과가 크게 달라지며 그 중에서도 용매로서 chloroform이나 n-hexane 보다는 에탄올 추출물이 매우 높은 항산화 효과를 가지는 것을 알 수 있었다. 이러한 추출용매에 따른 항산화 효과의 변화는 용매의 극성정도에 기인한 추출성분의 차이로 보여진다. 또한 GO 20 mU/mL 만을 처리한 구에서는 쥐 뇌세포의 생존율이 56%인데 반하여 10  $\mu$ L (2,727  $\mu$ g/mL) 조 에탄올 추출물 처리구는 95%의 생존율로서 항산화 효과가 컸고, 일반적인 경향은 조 에탄올 추출물 첨가량의 증가에 따라 점차적으로 hydroxy radical에 의한 쥐 뇌세포의 손상이 보호되어 살아있는 세포수가 증가하는 것을 보여주었다. 따라서 조 에탄올 추출물의 항산화 효과는 catalase와 비교했을 때 273배의

차이를 나타내준다. 결론적으로 조 에탄올 추출물은 hydroxyl radical에 대한 강력한 scavenger로서 의미되어지며, 이는 뇌세포에 있어서 radical의 damage에 의해 야기되는 여러 질병의 예방에 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시해준다.

따라서 앞으로의 연구로서 항산화 효과의 원인 물질의 동정, 다른 추출물의 항산화력 유무, 그리고 다른 생리적 효과를 확인해야 할 것으로 본다.

## 요 약

율나무를 극성이 각각 다른 chloroform, n-hexane, ethanol에 침지한후 추출물질에 따라 항산화력을 DPPH 및 thiocyanate 방법으로 측정했으며, 쥐 뇌세포를 배양하여 glucose oxidase (GO)에 의해 생성되는 hydroxy radical에 대한 항산화 효과를 측정하였다.

DPPH 및 thiocyanate 방법에 의한 항산화력은 에탄올 추출물의 항산화력이 다른 용매로 추출한 것에 비해 높았고, column을 이용해 100drop씩 분획하여 얻은 에탄올 추출물 5개 peak 중 peak II의 항산화력이 thiocyanate 방법으로 측정한 결과 다른 peak에 비해 컸으며, peak III와 IV의 항산화력은 적었고, peak I과 V의 항산화력은 매우 약하게 나타났다.

항산화 효과에 있어서 쥐 뇌세포에 에탄올 추출물 (30 mg/mL)로서, GO 20 mU/mL system의 hydroxy radical에 대한 에탄올 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과는 GO 20 mU/mL만을 처리한 구에서는 쥐 뇌세포의 생존율이 56%인데 반하여, 율나무 에탄올 추출물을 1  $\mu$ L (297  $\mu$ g/mL)와 2  $\mu$ L (588  $\mu$ g/mL) 첨가시 생존율은 대조구에 비해 각각 59%와 68% 였으며, 4  $\mu$ L (1,154  $\mu$ g/mL) 첨가시 74%, 7  $\mu$ L (1,963  $\mu$ g/mL)와 10  $\mu$ L (2,727  $\mu$ g/mL) 첨가시 각각 83% 및 95%로서 높은 생존율을 보였다. 이것은 에탄올 추출물 10  $\mu$ L (2,727  $\mu$ g/mL)첨가에 있어서 hydroxy radical에 대한 항산화 효과를 대조구에 비교할 때 P  $\leq$  0.01의 유의성을 보여주었다. 한편 에탄올 추출물과 천연항산화제인 ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, catalase의 항산화 효과를 비교한 결과 쥐 뇌세포 생존율이 대조구에 비해 10  $\mu$ L (2,727  $\mu$ g/mL) 에탄올 추출물 첨가시 95%이었고, 10  $\mu$ g/mL, 20  $\mu$ g/mL catalase에서는 각각 98%와 99% 였으며, 50 uM, 100 uM ascorbic acid는 각각 83%와 88%, 50 uM, 100 uM  $\alpha$ -tocopherol에서는 각각 72%, 77%로 나타났다. 따라서 에탄올 추출물 273  $\mu$ g/mL은 1  $\mu$ g/mL catalase에 상응되는 항산화력을 가지고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년 학술진흥재단(지역개발)연구비 지원으로 이루어진 결과로서 이에 감사드립니다.

## 문헌

- Adelman, R., Saul, R.L. and Ames, B.N.: Oxidative stress to DNA : Relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2706 (1988)
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915 (1993)
- Packer, L.: Oxidative stress, antioxidants, aging and disease. *Oxidants and Antioxidants*, p.1 (1995)
- Burdon, R.H.: Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 775 (1995)
- Yuichiro, S., Henry J.F. and Sevanian, A.: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**, 269 (1997)
- Adams, Jr. J.D. and Odunze, I.N.: Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.*, **10**, 161 (1991)
- Barry, H. and Okezie, I.A.: DNA and free radicals. Ellis Horwood, p.1 (1993)
- Shacter, E., Beecham, E.J., Covey, J.M., Kohn, K.W. and Potter, M.: Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis*, **9**, 2297 (1988)
- Spina, M.B. and Cohen, G.: Dopamine turnover and glutathione oxidation: Implication for parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1398 (1989)
- Branen, A.L.: Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59 (1975)
- 최석영, 양규환 : 항산화제 BHT와 BHA의 안정성. 한국식품과학회지, **14**, 283 (1982)
- Chang, S.S., Matijasevic, B.O., Hsieh, O.A.L. and Hwang, C.H.: Natural antioxidants rosemary and sage. *J. Food Sci.* **42**, 1102 (1977)
- 이준석 : TBHQ, BHA/BHT 및 methyl silicone이 식유의 저장성과 고온에서의 안정성에 미치는 영향. 한국식품과학회지, **10**, 250 (1978)
- Schafer, E. and Amrich, L.: Effects of dietary vitamin E on serum and pulmonary fatty acid as prostaglandins in rats fed excess linoleic acid. *J. Nutr.* **144**, 1130 (1984)
- Choe, S.Y. and Yang, K.H.: Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **14**, 283 (1982)
- 박원봉, 김덕숙 : 저장조건에 따른 신선초 생즙의 베타 카로틴과 비타민 C의 함량 및 항산화능의 변화. 한국식품과학회지, **27**, 375 (1995)
- 이형옥 : 토코페롤류의 항산화 작용과 linoleic acid methylester에서 생성된 cis/trans, trans/trans-hydroperoxide isomer. 한국식품과학회지, **25**, 307 (1993)
- 이연재, 신동화, 장영상, 강우석 : 붉나무 순차용매 추출물의 항산화 효과 비교. 한국식품과학회지, **25**, 677 (1993)
- 김태정 : 한국의 자원식물(II). 서울대학교 출판부, p 292-294 (1996)
- 최영전 : 한국민속식물. 아카데미, p 247-248 (1992)
- Lee, J.C. and Lim, K.T.: Stress response by copper, selenium as environmental pollutant in mouse tissues. *Korean J. Environ. Biol.* **14**, 177 (1996)
- Tomohiro, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. and Sakata, K.: A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by murine bacteria from fish and shellfish. *Biol. Biotech. Biochem.* **58**, 1780 (1994)
- Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods*, **65**, 55 (1983)
- Michikawa, M., Lim, K.T., Mclarnon, J.G. and Kim, S. U.: Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J. Neuroscience Research*, **37**, 62 (1994)
- Lim, K.T., Park, S.T., Chol, M.K. and Chung, Y.T.: Neuronal cytotoxicity of oxygen radical in newborn mouse forebrain culture. *Korean J. Toxicol.* **11**, 187 (1995)
- 윤석권, 김정환, 김재욱 : 탈지들깨박 에탄올 추출물의 항산화효과. 한국식품과학회지, **25**, 160 (1993)
- 이연재, 신동화, 장영상, 신재익 : 폐모 어성초, 쇠비름 및 들깨박 에탄올 추출물의 순차 용매 분획별 항산화 효과. 한국식품과학회지, **25**, 683 (1993)
- Yaropolov, A.I., Skorobogatk'o, S.S. Vartanov. and Varfolomey, S.D.: Laccase; property, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **49**, 257 (1994)
- Okusa, K., Miyakoshi, T. and Chen, C.-L.: Comparative studies on dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol by laccase and peroxidases. *Holzforschung*, **50**, 15 (1996)
- Samuni, A., Chevion, M. and Czapski, G.: Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.* **256**, 12632 (1981)

(1997년 5월 3일 접수)