

솔잎 醱酵液의 抗酸化效果

문연자, 임난영, 이성원, 강대길, 백순기¹, 우원홍
원광대학교 한의학전문대학원, 한약자원개발학과, ¹동신대학교 환경공학과

Abstract

Antioxidative effects of the fermented extract of *Pinus densiflora*

Yeun Ja Mun, Nan Young Lim, Sung Won Lee,
Dae Gill Kang, Soon Ki Baik¹, Won Hong Woo

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine,
Wonkwang University, ¹Dept of Environmental Eng. Dongshin University

This study was performed to investigate the effects of fermented extract of *Pinus densiflora* (FPD) on oxygen radicals and H₂O₂-induced damage.

The results are as follows:

1. The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals were considerably reduced by FPD and IC₅₀ value was showed the concentration of 20 µg/ml .
2. The cytotoxicity did not observe by FPD treatment in A548 cells.
3. The H₂O₂-induced cell damage was recovered by FPD pretreatment in A549 cells.

These results suggest that FPD, as a natural antioxidant, has scavenging effect of free radicals and protection effect from H₂O₂-induced cytotoxicity.

Key words : fermented extract of *Pinus densiflora* (FPD), oxygen radicals, H₂O₂-induced damage, antioxidant

교신저자 : 우 원 홍

전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원

TEL : 063-850-6845

E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr

접수일자 : 2002. 11. 21

채택일자 : 2002. 12. 21

* 본 연구는 '어수대솔바람' 의 지원에 의해 수행되었음.

I. 緒 論

인간을 비롯한 好氣性 생물은 산소를 전자수용체로 하는 呼吸을 통해 에너지를 획득한다. 그러나 이와 같이 生命維持에 절대적으로 필요한 산소이지만 안정한 분자상태인 기저삼중항산소(ground state triplet oxygen)가 체내 효소계, 還元代謝, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 반응성이 매우 큰 활성산소(active oxygen)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다. 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 破壞作用을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾.

한편, 정상적인 세포에서도 대사과정 중 어느 정도의 free radical과 기타 활성산소 및 과산화물이 생성되고 있으나 생체 내에는 이들에 대한 방어기구로서 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다^{4,5)}. 그러나 이와 같은 생체방어 기구에 이상이 초래되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)가 야기된다. 따라서 이와 같은 free radical을 소거할 수 있는 화합물 (free radical

scavengers) 또는 과산화물 생성 억제물질과 같은 항산화제들은 이들 산화물들에 기인하는 노화 및 각종 질환의 억제 또는 治療劑로서 기대된다.

솔잎은 祛風燥濕, 殺蟲止痒,의 효능이 있어 風濕痺痛, 失眠, 浮腫, 濕瘡, 瘡癬瘙痒의 병증을 치료한다하였으며⁶⁾, 《동의보감(東醫寶鑑)》에는 '風濕瘡을 主治하고 毛髮을 나게하며 五臟을 편히하여 수명을 연장한다'는 기록이 있다⁷⁾. 솔잎에 대한 실험적인 연구 결과로는 고질혈증 및 간기능 개선, 항암, 항균, 항산화 작용등의 효과가 있으며⁸⁻¹¹⁾, 유효성분으로는 α -onene, β -pinene, camphene 등의 정유성분, quercetin, kaempferol 등의 flavonoid류가 보고되어 있다^{11,12)}. 이와 같이 솔잎추출물에 대한 연구는 많이 이루어져왔으나 현재까지 솔잎 醱酵液에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 솔잎 醱酵液의 항산화효과와 세포의 산화적 스트레스에 의한 손상으로부터 防禦效果를 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

실험에 사용한 솔잎 醱酵液은 어수대솔바람(전북 부안 제78호)의 혼합음료로 햇솔잎(69.7%), 송화(0.5%), 솔고동(25%), 정백당(4.8%)으로 이루어졌으며 원액을 실험에 사용하였다(제조방법미기재)

2. 자유기제거 試驗

솔잎 醱酵液의 자유기 제거 효과를 Uchiyama 등의¹³⁾ 方法에 따라 1,1-

diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma) 을 이용하여 測定하였다. 0.1 M 아세트산 완충액 (pH 5.5) 1ml, 각 시료 0.1ml, DW 0.9ml 및 0.5 mM DPPH 0.5ml를 첨가하여 총량을 2.5ml로 하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

자유기 저해율 (Free radical inhibition) (%) = $[1 - (\text{시료군-Blank}) / (\text{대조군-Blank})] \times 100$ 으로 나타냈으며, DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도 (IC₅₀)으로 나타내었다.

3. 細胞培養

실험에 이용한 A549 세포주(한국세포주은행)의 배양은 CO₂ 배양기(37°C, 5%)에서 10% fetal bovine serum이 포함된 3일 마다 3 ml의 trypsin-EDTA(Gibco BRL, Life Technologies Inc., U.S.A.) 용액을 사용하여 계대배양을 실시하였다.

4. 細胞 生存率 測定

細胞의 生存率은 MTT assay 方法을 이용하여 測定하였다¹⁴⁾. MTT assay는 細胞의 生育 및 分化를 測定하는 assay로서 살아있는 細胞의 미토콘드리아 내 dehydrogenase enzymes가 3-(4,5dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 dark blue formazan로 전환시키는 원리를 이용한 colorimetric assay이다.

세포배양판(24-well plate)에 1×10^5 씩 세포를 분주하고 24시간 후, 실험에 필요한 각 농도별 솔잎 醱酵液과 산화적 스트레스를 유도하기 위하여 100 μM의 H₂O₂를 처리하였다. 培養이 완료된 후 세포 생존율의 판정은 MTT를 최종농도 100 μg/ml

가 되도록 처리하고 4시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100 μl의 10% SDS가 포함된 0.01N HCl 용액으로 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 방치하여 녹인 다음, ELISA reader로 540nm의 파장에서 흡광도를 測定하여 결정하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 솔잎 醱酵液의 항산화효과

활성산소는 산소라디칼(oxygen free radical) 및 이것으로부터 派生된 여러가지 산소화합물인 슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical, O₂⁻) 하이드록실 라디칼 (hydroxyl radical, ·OH), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂), 일중항산소 (singlet oxygen, ¹O₂) 들을 통칭하는 것으로, 주위의 화합물과 쉽게 반응하여 전자를 잃거나 얻으려 하기 때문에 높은 반응성을 갖는다^{4,15)}. 지질과산화의 連鎖 反應 등에 관여하는 산화성 프리라디칼을 소거함으로써 또는 환원력에 의해 항산화 작용을 하는 물질을 檢索함에 있어서, DPPH 프리라디칼이 이용될 수 있으며, 이 라디칼은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine의 형태로 환원되면서 脫色되어 517 nm에서의 흡광도 감소로 이를 측정한다¹³⁾.

본 실험결과 솔잎 醱酵液은 10 μg/ml에서 6.25%, 30 μg/ml에서 43.75%, 50 μg/ml에서 78.12%로 매우 효과적으로 DPPH 프리라디칼을 소거하는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 또한 100 μM의 DPPH의 50%를 환원시키는데 필요한 농도, 즉 IC₅₀은 20 μg/ml로서 천연 항산화제 L-ascorbic

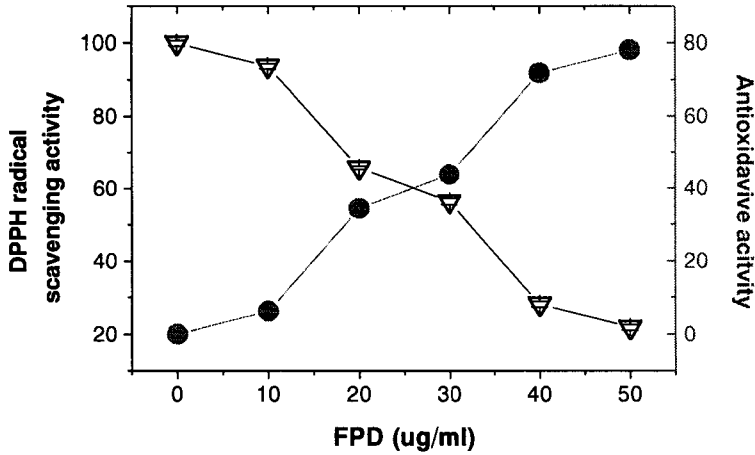


Fig. 1. Scavenging effect of FPD against DPPH free radicals

The ethanolic solution of 100 μM of DPPH free radicals with the addition of FPD was kept at 37°C for 10 min, and then the absorbance was measured at 517 nm. Results are expressed as % of control and data are means \pm SD of three experiments performed in triplicate.

Closed circle: DPPH radical scavenging activity; *Open triangle*: antioxidative activity.

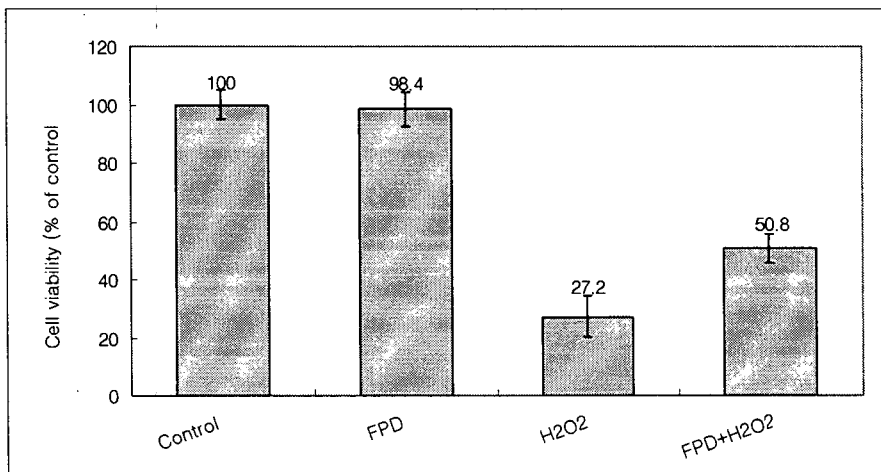


Fig. 2. Protective effect of FPD on H₂O₂-induced damage in A549 cells.

A549 cells were preincubated with FPD (30 $\mu\text{g/ml}$) before exposure to 100 μM H₂O₂. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results are expressed as % of control and data are means \pm SD of three experiments performed in triplicate.

acid의 21 µg/ml와 합성 항산화제인 tert-butylhydroxytoluene (BHT)의 18 µg/ml와 같은 정도의 항산화효과를 나타내고 있다 (Table 1).

Table 1. IC₅₀ value of FPD against DPPH free radicals.

Materials	IC ₅₀ value (µg/ml)
FPD	20
BHA	18
L-ascorbic acid	21

IC₅₀ values indicate the concentration that inhibits the 50% of DPPH radical scavenging activity.

이는 부 등11)에 의한 50% 수용성 에탄올 술잎 추출물의 IC₅₀(16 µg/ml) 농도와 비교하여 볼 때, 술잎 醱酵液의 DPPH 라디칼 소거효과가 술잎 에탄올추출물의 효과와 거의 비슷한 것으로 나타났다.

2. 세포의 프리라디칼 損傷으로부터 술잎 醱酵液의 防禦效果

활성산소를 비롯한 산화성 프리라디칼은 정상적인 세포대사과정, 약물대사과정, 허혈 재관류, 자외선 등에 의해 세포 내에서 지속적으로 생성되며, 생체는 프리라디칼 반응의 유해 효과에 항상 露出되어 있다고 볼 수 있다^{5,15,16}).

본 실험에서는 DPPH 시험 결과 우수한 항산화력을 나타낸 술잎 醱酵液이 세포의 산화적 스트레스에 미치는 영향을 조사하였다. 산화적 스트레스를 유도하기 위하여 A549 세포에 100 µM 과산화수소(H₂O₂)를 처리하였고, 술잎 醱酵液의 산화적 스트레스로부터 防禦效果는 세포생존률로 측정하였다. 실험결과 술잎 醱酵液 자체의

독성은 없었으며, H₂O₂ 처리군은 세포생존률이 대조군의 27.2%로 독성이 매우 심하였다. 그러나 술잎 醱酵液 전처리군에서는 세포생존률이 대조군의 50.8%로 나타나, 술잎 醱酵液은 H₂O₂의 세포독성을 감소시켰고, H₂O₂의 세포독성으로부터 방어효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

식물체는 다양한 형태의 항산화물질을 함유하고 있어 이들로부터 분리된 항산화물질들은 각종 프리라디칼이 관여하는 질환들에 대하여 유익한 작용을 할 것으로 기대되고 있으며, 술잎은 예로부터 중풍을 豫防하고 건위, 보혈작용이 있고, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병과 같은 질환을 豫防하는 效能이 있는 것으로 알려져 왔다^{6,7}). 지금까지 開發되어 사용되고 있는 항산화제로는 tert-butylhydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroxyanisol (BHA)등과 같은 합성 항산화제, α-tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids, 탄닌 등과 같은 일부 천연 항산화제 및 SOD와 같은 항산화 효소에 局限되어 있다¹⁷).

그런데 이들 항산화제는 독성, 저활성 및 용도의 한계성 등의 여러 가지 문제로 인하여 의약활성물질로 사용하는 데에 있어서 많은 問題點을 내포하고 있다. 따라서 천연으로부터 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 신규 항산화제의 개발이 요구되고 있으며 술잎 醱酵液은 세포독성이 없이 프리라디칼 소거능이 뛰어나 이에 적합한 물질로 思料된다.

본 연구는 술잎 醱酵液의 생체에서의 생리활성을 규명하기 위한 노력의 일환으로 진행되었으며, 그 결과 술잎을 주성분으로 하는 술잎 醱酵液이 천연 항산화제로서 프리라디칼 소거작용이 뛰어나며 H₂O₂의 세

포독성으로부터 防禦效果가 있음을 알 수 있었다.

IV. 結 論

술잎 醱酵液의 항산화효과와 세포의 산화적 스트레스에 의한 손상으로부터 防禦效果를 조사하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 술잎 醱酵液은 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 매우 효과적으로 DPPH 프리라디칼을 소거하였으며, IC_{50} 농도는 20 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다.
2. 술잎 醱酵液은 A549 세포에 毒性을 나타내지 않았다.
3. 술잎 醱酵液은 A549 세포에서 H_2O_2 처리에 의한 세포생존률 減少를 回復시켰다.

이상의 결과 술잎을 주성분으로 하는 술잎 醱酵液은 천연 항산화제로서 프리라디칼 소거작용이 뛰어나며 H_2O_2 의 細胞毒性으로부터 防禦效果가 있음을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

1. Brunk, U.T., Jones, C.B., Sohal, R.S. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat. Res.* 275(3-6), 395-403, 1992.
2. Channon KM. Oxidative stress and coronary plaque stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(11):1751-1752, 2002.
3. Perry G, Nunomura A, Cash AD, Taddeo MA, Hirai K, Aliev G, Avila J, Wataya T, Shimohama S, Atwood CS, Smith MA. Reactive oxygen: its sources and significance in Alzheimer disease. *J Neural Transm Suppl.* (62):69-75, 2002.
4. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 244(22): 6056-6063, 1969.
5. Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 133(4):493-505, 2002.
6. 신민교 : 임상본초학, 서울, 영림사, pp694-695, 1997.
7. 원진희 : 정교동의보감, 서울, 도서출판 한미의학, p. 1201, 2001.
8. 강윤환, 박용곤, 하태열, 문광덕 : 술잎 추출물이 고지방식을 급여한 흰쥐의 혈청과 간장 지질 조성에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, 25(3): 367-373, 1996.
9. 하태열, 박용곤, 문광덕, 강윤환 : 술잎 추출물이 고지방식을 급여한 흰쥐의 혈청, 간장의 효소 및 간조직구조에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, 25(3),

- pp. 374-378, 1996.
10. 한영복, 김진석, 문정조 : 솔잎, *Pinus densiflora* Sieb . et Zucc.,의 항암효과에 대한 연구. *대한수의학회지*, 33(4), pp. 701-710, 1993.
 11. 부용출, 전체옥, 오지연 : 솔잎으로부터 항산화 성분인 4-hydroxy-5-methyl-3 [2H]-furanone 의 분리. *한국농화학회지*, 37(4) pp. 310-314, 1994.
 12. Namikosi, M., Saitoh, T. Homio-soflavoids and related compound. IV. Absolute configurations of homio-soflavonoids from caesalpinia sappan L. *Chem. Pharm. Bull.* 35(9), 3579-3602, 1987.
 13. Uchiyama M, Suzuki Y, Fukuzawa K. Biochemical studies of the physiological function of toco-pheronolactone. *Yakugaku Zasshi.* 88(6): 678-83, 1968.
 14. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63, 1983.
 15. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 91(3C):14S-22S, 1991.
 16. Raff, M.C., Bares, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., Jacobson, M.D. Programed cell death and the control of cell survival. *Science*, 262, 695-700, 1993.
 17. Esteves MA, Narender N, Marcelo-Curto MJ, Gigante B. Synthetic derivatives of abietic acid with radical scavenging activity. *J Nat Prod.* 64(6): 761-766, 2001.