

유색미의 생물활성 검색

한상준 · 김주선 · 채성욱 · 강삼식* · 류수노¹ · 현진원² · 손건호³ · 손호용³ · 장현욱⁴
서울대학교 약학대학 천연물과학연구소, ¹한국방송통신대학교 농학과, ²제주대학교 의과대학 생화학교실,
³안동대학교 생활과학대학 식품영양학과, ⁴영남대학교 약학대학

Biological Screening of Extracts from the Colored Rice Cultivars

Sang Jun Han, Ju Sun Kim, Sungwook Chae, Sam Sik Kang*, Su Noh Ryu¹, Jin Won Hyun²,
Kun Ho Son³, Ho-Yong Sohn³, and Hyeun Wook Chang⁴

Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

¹Department of Agricultural Science, Korea National Open University, Seoul 110-791, Korea

²Department of Biochemistry and Applied Radiological Science Research Institute, College of Medicine,
Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

³Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

⁴College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract – Black colored rice has long been consumed in Oriental countries and is considered to be a healthy food. Extracts from rice with three different colors (white, black, and green) were prepared by using 80% MeOH and subjected to biological screening activities. The levels of antioxidative activity of black colored rice cultivars such as C3GHi and Heugjinjubyeo in radical scavenging activity were higher than those of the related white and green rice ones. When the effect of the extracts on thrombin time inhibition was analyzed, the extract from Heugjinjubyeo showed a dose-dependent suppressive activity. In addition, all the extracts tested did not inhibit the cyclooxygenase activity. Therefore the health benefits of the colored rice are attributed in part to their unique phytochemical composition such as high level of anthocyanin pigments with other minor strong antioxidant components for potential use in nutraceutical or functional food formulations.

Key words – Black colored rice, biological activity, antioxidative, thrombin time inhibition, cyclooxygenase inhibition

쌀은 전세계적으로 약 절반에 해당하는 인구가 주식으로 사용하고 있을 만큼 매우 중요한 작물이며, 특히 아시아 각국에서 그 중요성은 다른 식품에 비유할 수 없을 정도로 크다.¹⁾ 쌀의 품종은 시대의 요구에 따라 개량되어 왔으며, 우리나라의 경우 최근에 기능성 쌀 생산과 그 이용에 많은 관심을 기울여 왔다. 쌀에 다량 함유된 기능성물질은 천연 색소, 불포화지방산 등이며, 이들 성분 이외에도 γ -oryzanol, tocopherol, octacosanol 등의 미량함유 성분들이 성인병의 주된 질병인 뇌질환 및 심장질환의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 잘 알려져 있다. 이들 성분들은 특히 강한 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 체내대사로 생성된 활성산소종이나 라디칼 등은 100종 이상의 질병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며²⁾ 이를 예방하기 위하여 항산화활성을 가진 천연물 성분들에 관한 연

구가 활발하게 연구되어 왔다. 쌀의 품종 중 흑미는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등에서 건강식품으로 인식되어 애용되어 왔다. 흑미에 속하는 품종으로는 흑진주벼, 길림흑미, 흑남벼, 수원 425호 등의 품종이 잘 알려져 있으며, 이들 유색미에 함유되어 있는 주성분은 anthocyanin 성분중의 하나인 cyanidin 3-O-glucoside로 밝혀졌다.^{3,4)} 이 성분의 생물활성에 대하여서도 많은 연구결과가 보고되어 있다. 위에서 언급한 바와 같이 활성산소종이나 라디칼 등의 유해물질들은 많은 질병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려졌고 이중 특히 심장(혈관)질환, 염증질환 및 암 등이 대표적으로 알려져 있다.⁵⁾ 따라서 유색미 중 anthocyanin 함량이 높고 흑색을 띠는 C3GHi, 흑진주벼들과 녹색을 띠는 녹미 및 대조로 백미의 일종인 일품, 추정 등 5종의 품종들로부터 얻은 80% MeOH엑스에 대하여 항산화 활성을 비롯한 혈액응고 저해활성 및 항염작용의 활성을 검색하여 그 결과를 보고하고자 한다.

*교신저자(E-mail): sskang@snu.ac.kr
(FAX): 02-743-3323

Table I. Tested-rice materials and their extracts

Variety	Pericarp color	Dry wt (g)	80% MeOH Extracts (g)
Heuginjubyeo	Black	105.7	3.2
C3GHi	Black	105.9	5.2
Chucheongbyeo	White	103.7	2.5
Ipum	White	105.8	2.9
Green kernelled rice	Green	105.4	4.2

재료 및 방법

1. 검체의 조제

흑진주벼, C3GHi, 일품, 추정, 녹미 등 5종의 품종은 농촌진흥청 작물과학원과 한국방송통신대에서 재배한 재료를 사용하였다. 각 품종 100 g정도를 취하여 분쇄기로 마쇄한 후 얻은 검체에 80% MeOH 용액 250 ml씩 가하여 색소가 거의 용출되지 않을 때까지 냉침하였다. 이들 용액을 각각 합한 후 감압 농축하여 Table I과 같이 각각의 엑스를 얻었다.

2. 활성검색

2.1. 항산화활성

항산화활성의 측정은 Rosenkranz 등⁶⁾이 개발한 dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 사용한 DCF-DA법을 사용하였다.⁷⁾ 즉, V79-4 세포들을 10% 우태아 혈청 및 streptomycin (100 µg/ml)과 penicillin (100 unit/ml)을 포함한 DMEM배지에 현탁시켜 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이때 대수기에서 성장하는 세포를 취하여 well당 세포수가 4 × 10⁵ cell/ml가 되도록 96-well에 접종한 후 시료 추출물을 여러 농도로 처리한 후 같은 조건에서 30분간 배양하였다. 20 mM H₂O₂ 용액 10 µl씩 가하여 최종농도가 1 mM이 되도록 조절한 후 다시 배양기에서 30분간 배양한 후 미리 500 µM로 조제한 DCF-DA 용액 20 µl씩 가하여 분광형광광도계로 측정(excitation 485 nm, emission 535 nm)하였다. 시료를 가하지 않고 활성산소종의 생성만을 측정하는 것을 대조군으로 하여 시료를 가하여 활성산소종을 소거시키는 시료처리군과 비교하여 활성산소종의 저해율을 다음 식에 의하여 구하였다(3회 반복실험).

$$\text{활성산소종의 저해율(\%)} = \frac{\text{대조군 OD} - \text{시료처리군 OD}}{\text{대조군 OD}} \times 100$$

이때 2 mM 용액의 *N*-acetylcystein을 양성대조약물로 사용하였으며 이 대조약물의 저해율은 67.9%를 나타내었다.

2.2. 항혈전활성

Hsieh의 방법⁸⁾에 따라 항혈전활성을 thrombin time을 측

정하여 평가하였다.⁹⁾ 즉 thrombin time을 측정하기 위하여 37°C에서 0.5 µM thrombin (Sigma Co., USA) 50 µl와 20 µM CaCl₂ 50 µl, 다양한 농도의 시료추출액 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후 혈청 10 µl를 가하여 혈청이 응고될 때까지 시간을 측정하였다. 이때 대조시약으로는 아스피린 (Sigma Co.)를 사용하였으며 용매대조군으로는 시료대신 DMSO를 사용하였다. DMSO의 경우 32.1초의 응고시간을 나타내었다. Thrombin 저해효과는 3회 이상 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며 시료첨가시의 응고시간을 용매대조군의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다.

2.3. Cyclooxygenase 활성

비만세포의 배양 – Murakami 등¹⁰⁾의 방법으로 male Balb/c mice로부터 채취한 골수세포를 50% enriched medium (RPMI 1640 containing 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 10 mg/ml gentamycin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids and 10% fetal bovine serum)과 50% WEHI-3 cell-conditioned medium을 사용하여 3주 이상 배양하여 95% 이상의 homogenous한 bone marrow-derived mast cell (BMMC)를 얻었다.

Assay of PGD₂ Generation – Chang 등¹¹⁾의 방법으로 BMMC를 1 × 10⁶ cells/ml 농도로 하여 자극제로는 100 ng/ml KL (c-kit ligand), 100 U/ml IL-10, 100 ng/ml LPS를 처리하였다. COX-1의 활성의 측정은 검체를 일정 농도로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 자극제를 가한 후 2시간 후 배양 상등액 중에 생성되는 PGD₂의 생성량을 측정하였다. COX-2의 측정은 자극제를 가하여 8시간 동안 배양 후 PGD₂의 생성량을 측정하여 COX-2 활성으로 판정하였다. 이때 COX-2의 효소활성은 미리 10 µg/ml aspirin을 2시간 처리하여 COX-1을 불활성 시킨 후 실험을 행하였다. 반응이 끝난 후 120 × g, 4°C에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 PGD₂ 생성량의 측정에 이용하였다. PGD₂는 PGD₂ enzyme immunoassay kit (Cayman사)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

체내에서 superoxide anion (O₂⁻)이나 hydroxyl radical (OH[·])같은 활성산소종은 어느 면에서는 필수적인 방어수단이 될 수 있으나, 때로는 조직손상과 염증, 노화, 암, 동맥경화, 고혈압 및 당뇨병 같은 질병을 유발할 수도 있다. 그러므로 항산화활성을 갖는 방어수단으로 효소적인 수단으로는 superoxide dismutase (SOD)나 catalase (CAT)등이 중요하며, 비효소학적 수단으로서는 비타민 C, α-tocopherol, β-carotene, glutathione, flavonoid 등이 항산화제로서 잘 알려져 있다. 따라서 세포독성이 적고 강한 항산화효과를 나

타내는 새로운 물질들을 천연으로부터 분리하려는 노력이 지속되어 왔으며, 식품으로부터도 강한 항산화 효과를 나타내는 다수의 물질들이 보고되었다. 저자 등³⁾은 쌀 특히 유색미중에 함유되어 있는 anthocyanin 성분 중 가장 널리 분포되어 있는 cyanidin 3-O-glucoside가 강한 항산화작용이 있음을 보고한 바 있다. 계속적인 유색미에 대한 연구의 일환으로 흑미중의 한 품종인 흑진주벼의 쌀겨로부터 강한 항산화 활성이 있는 새로운 화합물인 oryzafuran을 분리하여 화학구조를 구명하여 보고한 바 있으며, 이 성분 이외에 flavonoid성분인 quercetin과 단순 phenol성 성분인 protocatechuic acid 및 vanillic acid 등도 강한 항산화 활성성분임을 보고¹²⁾한 바 있다. 이상의 결과를 토대로 우리 나라에서 현재 재배되고 있는 유색미 등 쌀 품종 5종을 선정하여 이들 추출물에 대한 항산화활성을 검색하였다. 또한 위에서도 언급한 바와 같이 성인병중 활성산소와 깊은 관련이 있다고 보고된 염증작용 및 혈액응고 저해활성에 관련된 COX 활성억제 효과와 thrombin활성 저해효과를 검색하였다. 항산화활성 검색법으로는 다수의 방법이 보고되어 이용되고 있으나 본 연구에서는 Rosenkranz 등⁶⁾이 개발한 DCF-DA 법을 사용하여 검색하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 5종의 쌀추출물 중 흑색을 띠는 C3GHi 및 흑진주벼 만이 100 µg/ml 농도에서 약 70%의 강한 radical소거능력이 있음을 보여주었으며, 이는 양성대조약물인 N-acetylcystein 2 mM 용액이 나타내는 라디칼 소거능력과 동등한 활성임을 보여주었다. 그러나 녹미 및 백미의 일종인 추정 및 일품벼는 각각 통계적인 유의성을 나타내지 않았다.

생체 구성성분으로 중요한 혈액은 다양한 기능을 가지고 있으며 이중 손상된 혈관 내에서 혈액손실을 최소화하기 위한 지혈기능의 이상으로 유래되는 뇌혈관질환이나 심장질환은 매우 치명적인 질환중의 하나이며 국민소득 증대와 고

령화 사회로의 진입으로 이들 질환은 급속하게 증가하고 있는 추세이다. 식이 중에 함유된 항산화제는 지방의 과산화를 억제하며, 지방과산화와 밀접한 관련이 있는 노화, 암, 심장병 같은 퇴행성질환의 발생빈도를 감소시킨다는 것은 주지의 사실이다. 한편 이들 색소들이 PLA₂나, cyclooxygenase, lipoxxygenase와 같은 효소반응에 관여하여 억제활성을 나타낸다는 사실도 잘 알려져 있다.^{13,14)} 이들 효소들은 산화제나 항산화제의 존재에 매우 민감하며, 혈소판응집, 대식세포, prostaglandin 및 leucotriene 생성에 있어 핵심적인 역할을 담당하고 있다. 이와 같이 식물색소들이 LDL의 산화를 억제하여 동맥경화를 예방시켜 주며, 혈전을 억제하여 응집과정에 관여하는 혈소판응집을 방해하여 혈액순환을 용이하게 한다.¹³⁾ 이런 관점에서 혈전생성에 중추적인 역할을 하고 있는 것으로 보고된 thrombin의 활성 저해물질은 과도한 혈액응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성 질환에 매우 유용한 예방 및 치료제로 사용될 수 있다. 지금까지는 주로 헤파린, coumarin유도체 및 아스피린, 유로키나제 등이 많이 사용되어 왔다. 위에서 얻은 쌀의 MeOH 엑스에 대하여 혈액응고 저해활성을 검색하기 위하여 Hsieh의 방법⁸⁾에 따라 thrombin time을 측정하여 평가하였다.⁹⁾ 그 결과 Table II에서와 같이 흑진주벼 엑스만이 3 mg/ml 농도에서 250% 정도의 thrombin 저해활성을 확인할 수 있었으나 다른 유색미나 백미의 엑스에서는 저해활성을 나타내지 않았다. 그러나 흑진주벼의 저해활성도 대조약물로 사용한 아스피린보다는 약하게 나타내었다. 또한 위에서 언급한 바와 같이 arachidonic acid cascade에 관련된 효소들에 식물색소들이 강한 억제활성이 있는 것으로 보고되어 있으므로^{14,15)} 강한 항산화 활성을 보여주고 있는 유색미의 엑스에 대하여 cyclooxygenase에 대한 활성검색을 실시하였다. 그러나 Table III과 같이 COX에 대한 저해활성은 나타내지 않음을 알았다.

위에서 검토한 활성 이외에도 흑미의 색소분획은 활성산소종과 NO활성을 억제하며⁴⁾ 동맥경화증 플라그 생성을 감소한다는 연구결과도 보고된 바 있다.¹⁶⁾ 이상의 결과들을 중

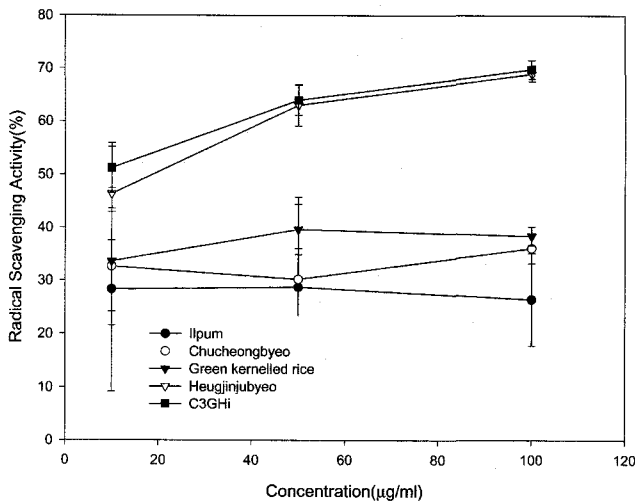


Fig. 1. Effects of rice extracts on radical scavenging activity.

Table II. Inhibitory activity of rice extracts against human thrombin determined by thrombin time

Variety	Thrombin time (%)		
	Concentration (mg/ml)		
	0.5	1.0	3.0
C3GHi	107.11	118.55	108.21
Heugjinjubyeo	115.23	139.75	247.96
Green kernelled rice	105.51	100.00	131.79
Ilpum	101.11	105.65	109.83
Chucheongbyeo	105.36	112.21	103.82
Aspirin*	137	311	392

*Thrombin time for DMSO was 32.1 second.

Table III. Cyclooxygenase inhibitory activities of the rice extracts

Variety	COX-1 Inhibition (%)	COX-2 Inhibition (%)
	(Final concentration 12.5 µg/ml)	(Final concentration 12.5 µg/ml)
Heugjinjubyeo	-85.0	8.0
C3GHi	-72.6	-7.4
Chucheongbyeo	-74.3	-14.1
Ilpum	-119.0	-33.3
Green kernelled rice	10.3	-30.1

합할 때 예로부터 건강식품으로 인식되어 온 흑미의 메타놀 엑스가 강한 항산화활성과 약한 thrombin활성 저해작용을 나타내는 반면에 녹미나 백미로부터 얻은 엑스들은 이들 활성을 나타내지 않음을 밝혔다. 따라서 본 실험을 통하여 흑미가 기능성식품으로서의 가치를 과학적으로 입증할 수 있는 자료를 추가적으로 제시하였다고 사료되며, 앞으로의 실험을 통하여 이들의 활성물질들을 탐색하고 이용하기 위한 연구가 절실히 요구되고 있다.

감사의 말씀

본 연구를 위하여 쌀 시료를 제공해 주신 작물과학원 관계자 분들께 감사의 말씀을 드리며, 본 연구는 농업특정연구사업(과제번호 : 0800520020003000)의 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

인용문헌

- Osawa, T., Ramarathnam, N., Kawakishi, S., and Namiki, M. (1992) Antioxidative Defense Systems Generated by Phenolic Plant Constituents. In Huang, M.-T., Ho, C.-T., Lee, C. Y. (ed.), Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. Antioxidants & Cancer Prevention, 122-134. American Chemical Society, Washington.
- Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Suda, I., and Sato, T. (2002) Polymeric Procyanidins as Radical-Scavenging Components in Red-Hulled Rice. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 7524-7529.
- Ryu, S. N., Park, S. Z., and Ho, C.-T. (1998) High Performance Liquid Chromatographic Determination of Anthocyanin Pigments in Some Varieties of Black Rice. *J. Food Drug Anal.* **6**: 729-736.
- Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W., and Kitts, D. D. (2003)

Black Rice (*Oryza sativa* L. *indica*) Pigmented Fraction Suppresses both Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Chemical and Biological Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5271-5277.

- Higashi-Okai, K., Kanbara, K., Amano, K., Hagiwara, A., Sugita, C., Matsumoto, N., and Okai, Y. (2004) Potent Antioxidative and Antigenotoxic Activity in Aqueous Extract of Japanese Rice Bran Association with Peroxidase Activity. *Phytother. Res.* **18**: 628-633.
- Rosenkranz, A. R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K. M., Chen, W., Knapp, W., and Zlabinger, G. J. (1992) A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J. Immunol. Meth.* **156**: 39-45.
- Chae, S., Kim, J. S., Kang, K. A., Bu, H. D., Lee, Y., Hyun, J. W., and Kang, S. S. (2004) Antioxidant Activity of Jionoside D from *Clerodendron trichotomum*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 1504-1508.
- Hsieh, K.-H. (1997) Thrombin interaction with fibrin polymerization sites. *Thrombosis Res.* **86**: 301-316.
- Sohn, H.-Y., Kwon, Y.-S., Kim, Y. S., Kwon, H.-Y., Kwon, G.-S., Kim, K.-J., Kwon, C.-S., and Son, K. H. (2004) Screening of Thrombin Inhibitors from Medicinal and Wild Plants. *Kor. J. Pharmacogn.*, **35**: 52-61.
- Moon, T. C., Murakami, M., Kudo, I., Son, K. H., Kim, H. P., and Chang, H. W. (1999) A new class of COX-2 inhibitor, rutaecarpine from *Evodia rutaecarpa*. *Inflammation Res.* **48**: 621-625.
- Chang, H. W., Baek, S. H., Chung, K. W., Son, K. H., Kim, H. P., and Kang, S. S. (1994) Inactivation of phospholipase A₂ by naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 843-849.
- Han, S. J., Ryu, S. N., and Kang, S. S. (2004) A New 2-Arylbenzofuran with Antioxidant Activity from the Black Colored Rice (*Oryza sativa* L.) Bran. *Chem. Pharm. Bull.* **52**: 1365-1366.
- Frankel, E. N. (1999) Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspectives. *Fett/Lipid* **101**: 450-455.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., and Kang, S. S. (2004) Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* **96**: 229-245.
- Potterat, O. (1997) Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Curr. Org. Chem.* **1**: 415-440.
- Xia, M., Ling, W. H., Ma, J., Kitts, D. D., and Zawistowski (2003) Supplementation of Diets with the Black Rice Pigment Fraction Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation in Apolipoprotein E Deficient Mice. *J. Nutr.* **133**: 744-751.

(2004년 11월 13일 접수)