

## 오디 추출물의 신경세포 보호활성 및 항균활성

김현복<sup>†</sup> · 김선여\* · 이항영\*\* · 김선림\*\*\* · 강석우

농업과학기술원, \*경희대학교 동서의학대학원, \*\*RNL 생명과학(주), \*\*\*작물과학원

### Protective Effect against Neuronal Cell and Inhibitory Activity against Bacteria of Mulberry Fruit Extracts

Hyun-Bok Kim<sup>†</sup>, Sun-yeou Kim\*, Hang-Young Lee\*\*, Sun-Lim Kim\*\*\*, and Seok-Woo Kang

National Institute of Agriculture Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

\*Graduate School of East-West Medical Science, Yongin 449-701, Korea

\*\*RNL Life Science Ltd., Suwon 441-744, Korea

\*\*\*National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

**ABSTRACT :** As functional evaluation of mulberry fruits extracts, the protective effect on cerebral cell and antibacterial activities were carried. 1% HCl-MeOH extract showed 37% cytoprotective effect on hydrogen peroxide, also C3G identified mulberry fruits and cyanidin showed 52%, 76%, respectively, protective effects on oxygen-glucose deprivation (OGD). In the antibacterial activity of mulberry fruit extracts, MeOH-Cheongil extract showed the highest inhibitory activity. *Salmonella typhimurium* was shown inhibitory rate more than 70% in all treatment groups. Also *Klebsiella pneumoniae* was shown inhibitory activity in all treatment groups.

**Keywords:** mulberry fruits extract, cytoprotective effect, antibacterial activity, C3G

오디에 대한 기록으로는 당나라 때 쓰여진 蘇經, 陳臟器(桑の文化誌, 1986), 우리나라의 東醫寶鑑(허준, 1994) 등 고의서를 비롯하여 全國韓醫科大學(1991)이 있으며, 그 효능에 대해서 언급되고 있는 내용을 살펴보면, ‘달고 차며 독이 없다’, ‘오장과 관절을 이롭게 하고 혈기를 통하게 한다’, ‘백발을 검게 하며 消渴을 덜어 주고 오장을 이롭게 하며 오래 먹으면 배고픔을 모르게 한다’ 이외에 浮腫억제, 宿醉제거, 消渴症제거, 대머리 豫防 및 治療 등에 사용된 것으로 기록되어 있다.

오디의 생리활성기능에 대한 연구결과로는 오디의 항당뇨 효능(Kim *et al.*, 1996), 뽕나무 오디 품종 중 항염증제로의 이용가능성이 높은 품종의 선발(Kim *et al.*, 1998) 및 오디 품종간 안토시아닌 색소의 주적출 대등맥의 수축·이완작용 구명(Park *et al.*, 1997) 등이 있으며, C3G(cyanidin-3-glucoside)

(Kim *et al.*, 2002; Kim & Kim, 2003), rutin(Kim & Kim, 2004), 지방산(Kim *et al.*, 2003b), 아미노산(Kim *et al.*, 2004), 유리당(Kim *et al.*, 2003a) 등 오디에 함유된 생리활성물질의 품종별 함량과 고품유 품종 등에 대한 연구결과가 발표되었다.

최근 천연색소에 대한 관심이 높아짐에 따라 식품이나 화장품 등에 첨가하여 기능성을 높이고자 하는 연구가 진행 중에 있고(Fuleke & Francis, 1968; Pirrie & Millims, 1976), 오디 중에 함유되어 있는 anthocyanin 색소를 추출하여 이용하고자 하는 연구도 시도되었다(Ko, 1994; Park *et al.*, 1997; 한국잡사학회, 1999).

Anthocyanin 색소는 식물학적으로 각종 곤충, 조류 등을 유인하여 화분의 수분 및 종자의 확산에 기여할 뿐 만 아니라(Kim *et al.*, 1999), 노화억제, 당뇨병성 망막장애의 치료(Scharrer & Ober, 1981) 및 시력개선(Politzer, 1977; Timberlake & Henry, 1988) 효과, 항산화 작용(Tamura & Yamagami, 1994; Yoshiki *et al.*, 1995; Rice-Evans *et al.*, 1995, 1996; Sichel *et al.*, 1991; van Acker *et al.*, 1995) 등 다양한 생리활성을 갖는 것으로 최근 보고됨(Hong *et al.*, 1997)에 따라 인체에 무해한 천연색소 및 기능성 소재로서 각광받고 있다.

이러한 관점에서 뽕나무의 열매인 오디는 기능성 및 천연색소 자원으로서 새로운 작목으로 유망시 되고 있다. 따라서 농가의 소득향상은 물론 소비자의 관심과 수요에 부응하기 위한 연구가 수행되어야 한다. 본 연구는 오디를 수확하여 신경세포 보호활성과 항균활성에 대한 오디 추출물의 효능을 평가함으로써 오디의 기능성 및 이용성을 증대시키고자 하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-31-290-8525 (E-mail) hyunbok@rda.go.kr

## 재료 및 방법

### 오디 추출물의 신경세포 보호 활성 검색

신경독성 물질 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리에 의해 유도되는 신경세포사에 대한 오디유래물질의 세포사멸 억제 효능 비교: PC 12 cells에서 Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 유도되는 세포상해에 대한 오디 효능평가를 위하여 각 시료를 1, 5 및 10 µg/ml을 처리하고 90분 후에 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 독성을 유도한 다음 24시간 후에 세포사에 의한 세포생존률을 위한 MTT assay를 수행하였다.

뇌교세포주인 BV-2 cell에서의 오디의 NO생성 억제효능 비교: BV-2 cell은 10% FBS와 1% penicillin streptomycin 이 첨가된 DMEM 배지하에서 배양하였다. 4×10<sup>4</sup> cells/well을 각 시료가 포함된 배지하에서 LPS를 처리하고 24시간 배양한 후 배양액을 50 µl 취하고 50 µl의 Griess reagent를 96 well plate에 넣고 상온에서 10분간 방치한 후 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. NaNO<sub>2</sub>를 NO<sub>2</sub> 농도를 측정하기 위하여 표준품으로 사용하였다.

Oxygen-glucose deprivation (OGD)에 의하여 유발된 뇌 허혈 모델에서의 오디의 뇌세포보호 효과 비교: PC 12 세포를 2.5×10<sup>4</sup> cells의 농도로 96 well에 접종한 후 10% FBS와 5% HS, 1% PS가 첨가된 RPMI(complemented media)에서 24시간 배양하였다. 24시간 경과 후 Normal 군은 complemented media로 교체하고 washing control군과 오디 추출물 처리군은 산소를 제거한 glucose free RPMI media로 washing 한 후 glucose free RPMI로 교체하였다. 오디 추출물 처리군과 control군을 hypoxia chamber에 배양하고, normal과 washing control군은 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 24시간 배양하였다.

24시간 배양 후 상층액을 제거하고 MTT (5 mg/ml)을 100 l를 첨가한 후 2시간 배양하고 DMSO를 넣어 생성된 formazan 결정을 녹인 후 ELISA reader로 측정하여 세포 사멸율을 확인하였다.

*In vivo* test: 흰쥐의 뇌에 혈액을 공급하는 중대동맥 (middle cerebral artery) 폐쇄에 의한 국소 뇌허혈 모델을 유도하였다. 시료 유발 후 0분, 2시간 후에 실험대조군은 20% tween 20을, 처리군에는 오디 추출물 각각을 100 mg/kg을 복강주사 하였다. +5 mm 부위로부터 2 mm 두께로 자른 후 양

쪽 끝조직을 버리고 6개의 절편을 얻어 2% 2,3,5-triphenyl-tetrazoliumchloride(TTC) 염색을 하였다. 염색된 부분의 뇌조직을 컴퓨터로 옮겨 image 분석 프로그램을 이용하여 뇌손상 부위의 부피를 측정하였다.

### 오디 추출물의 항균 활성 검색

시료액 조제: 오디 각 추출물 1 g에 멸균수 10 ml씩을 가하여 4°C, 13,000 rpm, 30분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 0.45 µm membrane filter로 제균한 후 여액을 실험에 사용하였다.

사용균주 및 배지: 실험에 사용한 균주는 *Micrococcus luteus* (ATCC 9374), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Bacillus subtilis* (ATCC 14893) 8종이었으며, 배지 및 배양조건은 ATCC의 product information sheet에 따랐다.

항균력 측정: 각 균주에 대한 오디 추출물의 세균 억제 정도를 확인하기 위하여 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 OD값을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 오디 추출물의 신경세포 보호 활성

신경독성 물질 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리에 의해 유도되는 신경세포사에 대한 오디 추출물의 세포사멸 억제 효능 비교: 오디 1% HCl-MeOH 추출물의 경우 1, 5 µg/ml의 농도로 처리하는 경우 hydrogen peroxide에 의하여 유도되는 세포독성을 방어하는 효과는 없었으나 10 µg/ml의 농도에서는 37%의 세포보호 효과를 나타냈다. 또한 오디에서 정제된 C3G의 경우 저농도에서는 효능을 나타내지 않았으나 10 µg/ml의 경우 26%의 세포보호 효과를 나타냈다. 그러나 오디에 존재하고 있는 것으로 알려진 주요 화합물인 cyanidin은 산화유도에 의한 세포독성에 대한 보호효과를 나타내지 않았다(Table 1).

뇌교세포주인 BV-2 cell에서의 오디의 NO생성 억제효능 비교: 오디 total 군은 NO를 미약한 수준으로 감소시켰으나

**Table 1.** Cytoprotective effects of mulberry fruit extracts on hydrogen peroxide.

MTT assay	Normal	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Total extract (µg/ml)			C3G (µg/ml)			Cyanidin (µg/ml)		
			1	5	10	1	5	10	1	5	10
Cell viability (%)	100±2.1	62.0±0.2	38.9	38.1	75.9	29.7	32.4	72.1	26.1	27.5	30.2

Cytoprotective effects of material extract of PC 12 cells injured by hydrogen peroxide. After pretreatment of PC 12 cells with materials (1, 5, 10 µg/ml) for 90 min, cell were exposed to hydrogen peroxide (150 µM) for 24 hr, then cytotoxicity were measured by MTT assay. Viability of hydrogen peroxide untreated cells was set to 100%. Values are mean±SD of percentage of normal group (n=6)

**Table 2.** Inhibitory effect of mulberry fruit extracts on microglial NO production.

Assay	Normal	LPS	Total extract (µg/ml)			C3G (µg/ml)			Cyanidin (µg/ml)		
			1	5	10	1	5	10	1	5	10
NO production (%)	37±2	100±4	101±1	95±1	92±2	92±1	98±3	115±4	94±1	89±0	87±2

Inhibitory effect on microglial NO production. Treatment of BV mouse microglia cells with LPS (100 µg/ml) for 24 hr. NO accumulated in culture supernatant was measured by Griess reaction.

**Table 3.** Protective effects of mulberry fruit extracts on OGD/oxygenation.

MTT assay	Normal	OGD	Total extract (µg/ml)			C3G (µg/ml)			Cyanidin (µg/ml)		
			1	5	10	1	5	10	1	5	10
Cell viability (%)	100±0	54±0	57±1	60±9	61±2	68±1	71±3	78±4*	75±1*	86±1**	89±2**

Protective effects of material on OGD/oxygenation induced neuronal injury on the PC 12 cells. Cultures were exposed to OGD for 2 hr following by 24 hr reoxygenation. Materials was added to the culture during the OGD exposure at the concentration of 1, 5, 10 µg/ml. Neuronal death was measured by MTT assay after 24 hr reoxygenation. The data are mean ± SD(n=3) of three different cultures (\*<0.05, \*\*<0.01)

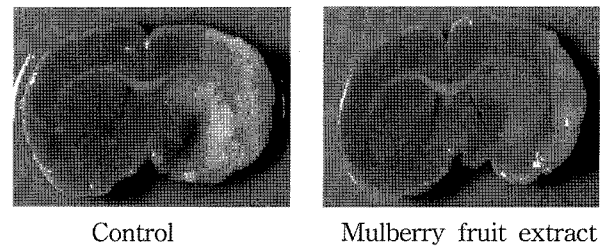
통계적 유의성은 없었고 단일화합물인 cyanidin의 경우도 농도의존적으로 NO를 감소시켰으나 그 효과가 10 µg/ml의 농도에서 13% NO를 줄임으로써 그 효과가 미약하였다(Table 2).

Oxygen-glucose deprivation (OGD)에 의하여 유발된 뇌허혈 모델에서의 오디의 뇌세포보호 효과: 오디 total 추출물의 경우 1, 5 및 10 µg/ml의 농도에 거의 효과가 미미하였고 오디C3G의 경우 농도 의존형으로 oxygen-glucose 고갈상태에서 일어나는 세포괴사를 막았다. 특히 단일화합물인 cyanidin의 경우는 10 µg/ml의 농도에서 70% 이상의 허혈유도에 의한 세포상해를 보호하였다(Table 3).

In vivo test: 6개의 절편 중 3번째 부위를 사진으로 찍은 것으로 뇌허혈이 유도되면 흰 부분으로 되는데 반해 오디 추출물을 투여한 군은 덜 하얗게 된 것을 확인하였다(Fig. 1).

**오디 추출물의 항균 활성**

오디 추출물과 C3G의 항균활성을 검정한 결과, 청일뽕 오디의 MeOH 추출물의 항균 활성이 가장 높았으나, *Salmonella*



**Fig. 1.** Comparison cerebral injury group with mulberry fruit extract group.

*typhimurium*의 경우 모든 처리군에서 70% 이상의 억제 활성을 나타냈다. 또한 *Klebsiella pneumoniae*에 있어서도 모든 처리군에서 억제 활성을 확인하였으며, 모든 처리군에서 50 µl 농도보다 100 µl 농도에서 균주의 억제 활성이 높게 나타났다(Table 4).

이상에서 오디 추출물의 뇌세포 보호 효능 및 항균 활성을 확인하였다. 이러한 결과를 오디를 이용한 가공제품 제조시 활

**Table 4.** Inhibitory activities of mulberry fruit extracts against bacteria.

Accession	Inhibition rate (%)							
	C3G-452		C3G-Cheongil 1		C3G-Cheongil 2		MeOH-Cheongil	
	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl
<i>Micrococcus luteus</i>	36.3	68.5	30.8	84.4	14.7	30.0	24.7	67.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	40.6	64.0	33.4	61.3	39.5	77.3	58.9	89.5
<i>Escherichia coli</i>	39.6	69.7	29.1	71.6	65.2	75.5	85.0	90.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	67.9	79.6	68.3	74.7	75.1	82.6	77.4	87.6
<i>Proteus mirabilis</i>	56.8	82.2	58.5	80.9	69.7	78.2	72.2	86.8
<i>Listeria monocytogenes</i>	34.9	65.0	15.6	50.9	12.8	41.6	74.1	87.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	70.9	81.5	72.5	77.2	79.8	85.3	81.0	88.7
<i>Bacillus subtilis</i>	55.5	75.9	57.3	75.4	71.5	79.8	71.9	86.6

용한다면 기능성이 확보된 고품질의 오디제품으로 이용할 수 있을 것으로 기대되며, 건강한 삶을 위해 보다 안전한 먹을 거리를 원하는 소비자의 욕구도 만족시킴으로써 오디의 기능성 및 이용성을 동시에 증진시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

## 적 요

최근 빵잎과 더불어 기능성 및 천연색소 자원으로서 뽕나무의 열매인 오디가 새로운 작목으로 유망시 되고 있다. 농가의 소득향상은 물론 소비자의 관심과 수요에 부응하기 위한 연구의 일환으로 오디를 수확하여 신경세포 보호활성과 항균활성에 대한 오디 추출물의 효능을 평가함으로써 오디의 기능성 및 이용성을 증대시키고자 하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 신경독성 물질 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의해 유도되는 신경세포사멸에 대하여 오디 추출물 10 µg/ml의 농도 처리시 37%의 세포보호 효과를 나타냈으며, Oxygen-glucose deprivation (OGD)에 의하여 유발된 뇌허혈 모델에서는 오디 C3G의 경우 농도 의존형으로 세포괴사를 막았다. 특히 cyanidin의 경우는 10 µg/ml의 농도에서 70% 이상의 뇌세포보호 효과를 나타냈다.

2. 오디 추출물과 C3G의 항균활성을 검정한 결과, 청일뽕 오디의 MeOH 추출물의 항균 활성이 가장 높았으나, *Salmonella typhimurium* 의 경우 모든 처리군에서 70% 이상의 억제 활성을 나타냈다. 모든 처리군에서 50 µl 농도보다 100 µl 농도에서 균주의 억제 활성이 높게 나타났다.

## 인용문헌

- Fuleki T. and F. J. Francis. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. 3. Purification of cranberry anthocyanins. *J. of Food Sci.* 33 : 266-274.
- Hong W., C. Guohua, and LP. Ronald. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem* 45 : 304-309.
- Kim, H. B. and S. L. Kim. 2003. Identification of C3G (cyanidin-3-glucoside) from Mulberry Fruits and Quantification with different Varieties. *Korean J. Seric. Sci.* 45(2) : 90-95.
- Kim, H. B. and S. L. Kim. 2004. Quantification and Varietal Variation of Rutin in Mulberry Fruits. *Korean J. Seric. Sci.* 46(1) : 1-5.
- Kim, H. B., S. L. Kim, and S. W. Kang. 2004. Varietal Analysis and Quantification of Amino Acid in Mulberry Fruits. *Korean J. Seric. Sci.* 46(2) : 47-53.
- Kim, H. B., S. L. Kim, and J. Y. Moon. 2002. Quantification and Varietal Variation of Anthocyanin Pigment in Mulberry Fruits. *Korean J. Breed.* 34(3) : 207-211.
- Kim, H. B., S. L. Kim, J. Y. Moon, and S. J. Chang. 2003 a. Quantification and Varietal Variation of Free Sugars in Mulberry Fruits. *Korean J. Seric. Sci.* 45(2) : 80-84.
- Kim, H. B., S. L. Kim, G. B. Sung, H. W. Nam, S. J. Chang, and J. Y. Moon. 2003 b. Quantification and Varietal Variation of Fatty Acids in Mulberry Fruits. *Korean J. Seric. Sci.* 45(2) : 75-79.
- Kim, S. L., E. H. Kim, Y. K. Son, J. C. Song, J. J. Hwang, and H. S. Hur. 1999. Identification of anthocyanin pigments in black waxy corn kernels. *Korean J. Breed.* 31(4) : 408-415.
- Kim, S. Y., K. J. Park, and W. C. Lee. 1998. Antiinflammatory and antioxidative effects of *Morus* spp. fruit extract. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6(3) : 204-209.
- Kim, T. W., Y. B. Kwon, J. H. Lee, I. S. Yang, J. K. Youm, H. S. Lee, and J. Y. Moon. 1996. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J. Seric. Sci.* 38 : 100-107.
- Ko, K. C. 1994. Studies on productivity and utilization of mulberry fruits for change into new fruit tree crop - studies on high quality and abundant fruiting and utilization of mulberry fruits (•\*) - RDA report(the 2nd continued).
- Park, S. W., Y. S. Jung, and K. C. Ko. 1997. Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 38 : 722-724.
- Pirie, A. J. and M. G. Mullins. 1976. Changes in anthocyanin and phenolics content of grape leaf and tissues treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. *Plant Physiol.* 58 : 468-472.
- Politzer, M. 1977. Experience in the medical treatment of progressive myopia. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 171 (4) : 616-619.
- Rice-Evans, C., N. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley, and J. B. Pridham. 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* 22 : 375-383.
- Rice-Evans, C., N. J. Miller, and G. Paganda. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* 20(7) : 933-956.
- Scharrer, A. and M. Ober. 1981. Anthocyanosides in the treatment of retinopathies. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 178 (5) : 386-389.
- Sichel, G., C. Corsaro, M. Scalla, A. J. Di Bilio, and R. P. Bonomo. 1991. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanin against O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. *Free Radical Biol. Med.* 11 : 1-8.
- Tamura, H. and A. Yamagami. 1994. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from muscat bailey a grape. *J. Agric. Food Chem.* 42 : 1612-1615.
- Timberlake, C. F. and B. S. Henry. 1988. Anthocyanins as natural food colorants. *Prog. Clin. Biol. Res.* 280 : 107-121.
- van Acker, S. A. B. E., M. N. J. L. Tromp, G. R. M. M. Haenen, W. J. F. van der Vijgh, and A. Bast. 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214(3) : 755-759.
- Yoshiki, Y., K. Okubo, and K. Igarashi. 1995. Chemiluminescence of anthocyanins in the presence of acetaldehyde and tert-butyl hydroperoxide. *J. Biolumin. Chemilumin.* 10 : 335-338.
- 本草學教授共編著. 1991. 全國韓醫科大學. 本草學 第17章 補益藥 : 桑子. 永林社. p 598.
- 社團法人 千曲會編, 桑の文化誌. 1986. 郷土出版社(松本市). pp 116-117.
- 한국잡사학회, 1999. 1999 심포지엄 뽕잎함유 생체활성성분의 식품이용 전망 자료집.
- 허 준, 1994. 동의보감, 具本泓 譯. 民衆書閣.