

Antioxidative Effects and Anticancer Activities of Puer Tea Extract

Hyo-Jeong Kim, Su-Won Kim, Sun-Ah Baek and Min Yoo[†]

Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Puer tea is a traditional beverage originating from Yunnan area of China. We have analyzed 11 different commercial tea brands provided by Daboo Culture and Art Center. This study was carried out to evaluate the contents of polyphenols, antibacterial activity, antioxidative ability and physiological activities of extracts from Puer tea. The electron donating ability was ranged from 57.26~99.16% and SOD-like activity was ranged from 1.4~10.4%. The inhibitory effect on the growth of cancer cell lines was examined by MTT assay. The Puer tea extract exhibited the greatest inhibitory effect at the concentration of 2% for all cancer cells tested.

Key Words: Puer tea, Antioxidative Effect, Anticancer activities, Cancer

서 론

보이차는 중국 운남의 대엽종으로 만든 쇠청모차로 일부는 사천 지방의 중엽종으로도 제조된다. 제조과정 중 여러 가지 미생물이 관여하여 미생물이 분비하는 효소에 의해 발효되는 후발효차로 검은색 혹은 흑갈색이다. 또한 보이차는 장기간 복용하여도 부작용이 없으므로 일본, 프랑스, 독일, 이태리, 마카오 등에서는 미용차, 다이어트차, 장수차 등으로 불리어지고 있으며, 보이차를 자주 마시면 체중을 감량시키는 효과가 있다고 하여 감비차(減肥茶) 혹은 요조차(窈窕茶)라고도 한다 (Son et al., 2005).

보이차는 차의 품질을 결정하는 기본 요소인 화학성분 중 우리 몸에 이로운 성분인 vitamin, tannin, flavanol, fravonoid 등과 폴리페놀을 다량 함유하고 있다 (So, 2005). 이들 물질들은 항산화, 항알러지, 항염증, 항암 등의 다양한 생리활성을 지닌 것으로 밝혀지고 있다. 이는 새로운 신약 및 건강기능성 음료를 개발하는데 기초가 될 수 있는 물질들이다. 폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 항혈전 작용, 고지혈증 및 지방간 억제 작용뿐 아니라 자연에서 얻은 항

산화제 중 가장 강력한 항산화 효과를 나타낸다 (Kim et al., 2003).

통계청에서 발표한 2009년 사망원인통계에 따르면 암으로 인한 사망률은 표준인구 10만 명당 사망자 수가 136.1명으로 가장 높았으며 폐암, 간암, 위암의 순이다. 특히 남자의 암 사망률은 여자보다 1.7배 더 높았고, 지난해에 비해 간암은 발생빈도에서 순위가 한 단계 더 상승하였다. 흔히 암 치료에 사용되고 있는 방법은 부작용으로 인해 많은 문제점을 가지고 있어서 이 점을 보완하기 위해 최근에는 천연물로부터 분리한 물질을 대상으로 항암 및 생리활성 효과 등을 검색하고 암 치료의 보조요법이나 암 예방을 위한 새로운 기능성 물질로 이용하고자 하는 연구가 많이 시도되고 있다 (Chihara et al., 1970; Miyajaki et al., 1981; Ha and Michael, 1991).

보이차가 항산화 작용과 항암 작용이 있다는 문헌이 있음에도 불구하고 아직 본격적인 과학적 입증은 미약한 실정이다. 본 연구에서는 보이차의 생리활성을 연구하고 새로운 천연 기능성 소재로의 기능성을 살펴보기 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 공시 재료인 보이차는 다부문화예술원 (경상북도 칠곡군 소재)에서 시료를 받아 실험에 사용하였다.

*접수일: 2010년 11월 19일 / 수정일: 2010년 12월 24일
채택일: 2010년 12월 27일

[†]교신저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000, 계명대학교 자연과학대학 생물학과
Tel: +82-53-580-5537, Fax: +82-53-580-5537
e-mail: ymin@kmu.ac.kr

시료의 추출

시료추출은 열수추출 및 에탄올추출을 하였다. 50 ml tube에 각각의 시료 2 g씩 넣고 용매 20 ml를 넣었다. 용매는 hot plate 위에서 100°C까지 가열하여 사용하였다. Shaking incubator에서 tube를 기울여서 80 rpm으로 60°C에서 1시간 동안 섞어주면서 시료를 추출하였다. 보이차 추출물은 Whatman No.2 여과지를 사용하여 1차 여과과정 후 pore size 0.45 µm syringe용 멸균 필터로 2차 여과과정 후 사용하였다.

사용 세포주와 배양

세포주는 총 7가지로 인체 암세포주인 HepG2 (간암), DU145 (전립선암), MDA-MB-231 (유방암), U87MG (뇌종양암), A549 (폐암), HeLa (자궁경부암), HT29 (결장암)를 계명대학교 의과대학 미생물학 교실에서 분양받아 사용하였다. 사용한 cell들은 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)과 RPMI (Rosewell Park Memorial Institute, USA)를 사용하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다.

전자공여능 측정

전자공여능은 Blois의 방법을 변형하여 실험하였다 (Bios, 1958). DPPH 시약은 실험 시작 전 에탄올에 녹인 후 0.2 mM이 되도록 하여 사용하였다. DPPH 용액과 희석된 시료를 1:1로 혼합하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 아래 식을 이용하여 백분율로 계산하였다.

$$EDA(\%) = (1 - A \div B) \times 100$$

A: 시료의 흡광도 값

B: 공시험구 (blank)의 흡광도 값

Superoxide Dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 따라 실시하였다 (Marklund and Marklund, 1975). 각각의 보이차 추출물 용액 0.2 ml에 Tris-HCl의 완충용액 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 1.0 N HCl 0.1 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된

pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 아래 식을 이용하여 백분율로 계산하였다.

$$SOD \text{ like activity } (\%) = (1 - B/A) \times 100$$

A: 대조구의 흡광도 값

B: 시료의 흡광도 값

Table 1. List of strains and media used for cell lines

Cell line	Media	24 hr	48 hr	72 hr
		(10 ³ /well)		
DU145	DMEM	4	2	1
HepG2	DMEM	4	2	1
MDA-MB-231	DMEM	3	1.5	0.8
U87MG	DMEM	4	2	1
A549	RPMI	4	3	2
HT29	RPMI	4	3	1.5
HeLa	RPMI	3	2	1

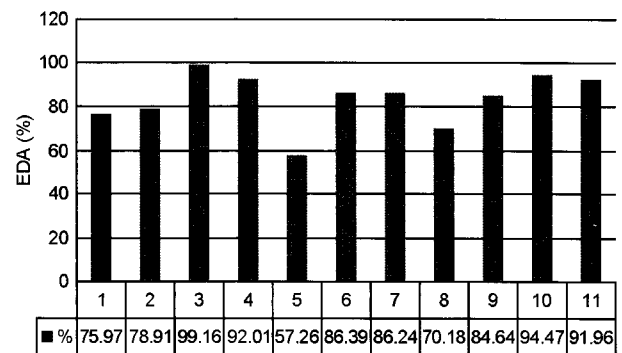


Fig. 1. Antioxidative effect of 11 Puer tea samples. Numbers represent samples used for the experiments. (■%: total contents). Same experiments were repeated at least 5 times. The value shown in this table is the mean.

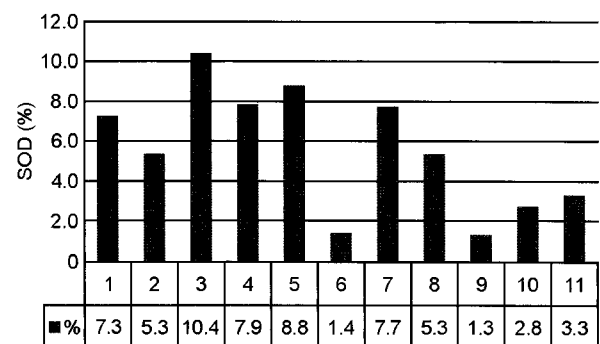


Fig. 2. SOD like activity of 11 Puer tea samples. Numbers represent samples used for the experiments. (■%: total contents). Same experiments were repeated at least 5 times. The value shown in this table is the mean.

MTT assay

세포의 대사활성이나 증식 및 세포독성을 측정하는데 사용되는 Mosmann의 MTT 정량분석법으로 측정하였다 (Mosmann, 1983). 먼저 세포를 trypsin으로 처리하여 떼어

낸 후 10 ml의 배지에 모았다. 배지 90 μ l에 시간별로 세포수가 Table 1과 같도록 분주하여 배양하였다. 18시간 후 보이차 추출물이 첨가된 배지 10 μ l를 0, 0.5, 1, 2% 농도로 각 well에 첨가하여 24시간, 48시간, 72시간으로 배양하였다. 배양 후 20 μ l의 MTS 시약과 media 100 μ l를 각

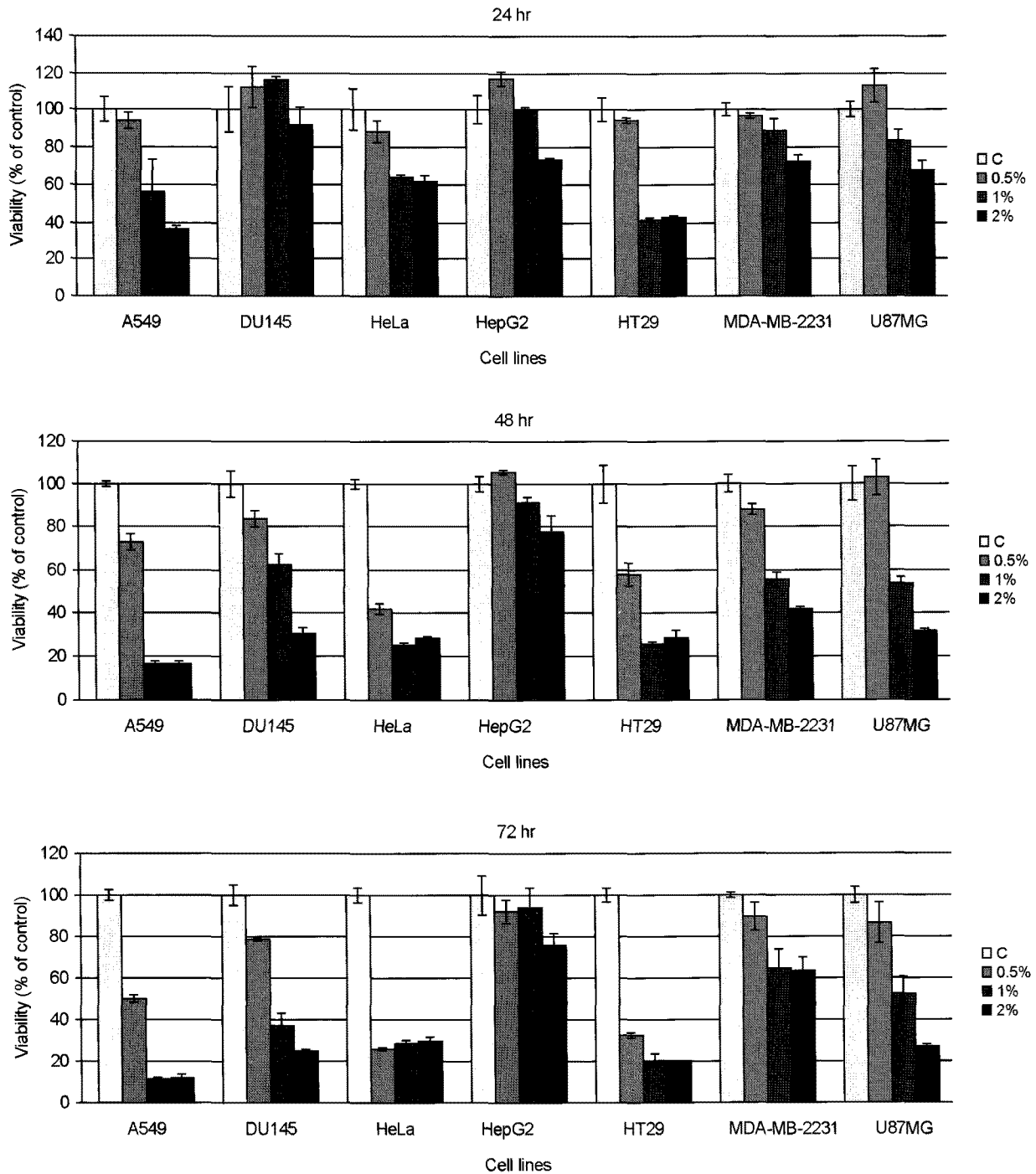


Fig. 3. Inhibitory effect of Puer tea extract on the growth of cell lines in MTT assay. C: control, 0.5%: Puer tea 0.5%, 1%: Pure tea 1%, 2%: Pure tea 2%. Same experiments were repeated at least 5 times. The value shown in this table is the mean.

각의 well에 첨가하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 1시간 동안 incubation 하였다. Formazan 생성물은 흡광도 490 nm에서 측정하여 확인하였다.

$$GI (\% \text{ growth inhibition}) = 100 \times (T - T_0) / (C - T_0)$$

T: 보이차 추출물과 시간별로 반응 후 측정된 흡광도 값

T₀: 시간별 반응 전의 흡광도 값

C: 대조군의 흡광도 값

결과 및 고찰

전자공여능 측정

전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 인체의 노화 억제 작용과 식품 중의 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있으며, 이를 측정하는 DPPH는 비교적 안정된 free radical로서 활성물질이 환원되어 자색으로 탈색되는 정도에 따라 항산화 활성 정도를 파악할 수 있다 (Shon et al., 2001).

총 11개 보이차 시료 추출물의 전자공여능 측정결과는 Fig. 1과 같다. 보이차 시료당 0.1 mg/ml의 농도에서 약 55~99%의 높은 전자공여능을 나타냈다. 전자공여능이 100%에 가까울수록 항산화 효과가 높은 것으로 여겨지므로 이 중 99.16%의 가장 높은 전자공여능을 보였으며 3번 시료에서, 5번 시료가 57.26%로 가장 낮은 전자공여능을 보였다.

SOD 유사활성 측정

SOD는 항산화 효소 중의 하나로 세포에 해로운 환원 산소를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. SOD 유사활성 물질의 섭취로 산화적 장애를 방어하고 노화 억제의 효과를 기대할 수 있을 것으로 보고되고 있다 (Kuramoto, 1992). 총 11개 보이차 시료 추출물의 SOD 유사활성 측정은 Fig. 2와 같다. 보이차 추출물을 100 mg/ml의 농도에서 측정된 결과 약 1~10% 정도의 활성을 나타냈다. 이 중 3번 시료에서 10.4%로 가장 유사활성이 크며, 9번 시료에서 1.3%로 가장 유사활성이 작음을 확인할 수 있었다.

MTT assay

총 7종의 cell에 보이차 추출물을 0, 0.5, 1, 2%의 농도로 처리한 뒤, 24, 48, 72시간 동안 배양하여 MTT assay를

조사하였다. 24시간에서 생존된 세포의 수가 모두 비슷한 수치를 나타냈었다. 농도별로 처리한 결과, 생존세포의 수가 가장 작음을 보인 세포는 A549였다. 또한 DU145, HeLa, HepG2, HT29, U87MG는 고농도로 갈수록 증식 억제가 된 것을 알 수 있었다. 그리고 MDA-MB-231 다른 세포주들과는 달리 조금 느리게 증식이 억제되었다. 48 시간에서는 모든 암세포주가 저농도인 0.5%에 비해 1%와 2%로 보이차 추출물을 처리한 곳에서 증식 억제가 많이 되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 24시간에서 조금 느리게 증식이 억제되었던 MDA-MB-231의 경우에도 생존된 세포의 수가 많이 줄었음을 알 수 있었다. 72시간에서는 모든 세포가 모든 농도에서 생존이 억제되었음을 확인할 수 있었으며, 0.5%에 비하여 1%와 2%에서 생존이 거의 억제되었음을 알 수 있었다 (Fig. 3). MTT assay 자체가 세포의 성장을 알아보는 실험이지만, 정상세포 등을 대조군으로 하여 이들과의 억제관계를 비교하는 등 실험을 계속할 필요성을 느꼈다.

Acknowledgment

본 연구는 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의한 것임.

REFERENCES

- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958. 26: 1199-1200.
- Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) sing. *Cancer Res.* 1970. 30: 2276-2781.
- Ha YL, Michael WP. Naturally-occurring novel anticarcinogens: Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA). *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 1991. 20: 401-407.
- Kim DR, Kwak GS, Jeong SM, Lee SC, Ha JU. Comparison of the antioxidative abilities of commercial gal geun tang. *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 2003. 32: 728-732.
- Kuramoto T. Development and application of food materials from plant extract such as SOD. *Up to Date Food Processing.* 1992. 27: 22-23.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide amino radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1975. 47: 468-474.
- Miyazaki T, Nishijima M. Structural examination of a water

- soluble antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*.
Chem Pharm Bull. 1981. 29: 3611-3616.
- Mostmann T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immuno Methods 1983. 65: 55-63.
- Shon MY, Seo JK, Kim HJ, Sung NJ. Chemical compositions and physiological activities of Doraji (*Platysodon grandiflorum*). J Kor Soc Food Sci Nutr. 2001. 30: 717-720.
- So EM. Antioxidative activity screening and active compounds separation of Puer Tea. MS. University of Wonkwang. 2005.
- Son GM, Bae SM, Chung JY, Shin DJ, Sung TS. Antioxidative effect on the green tea and Puer Tea extracts. Kor J Food Nutr. 2005. 18: 219-224.
-