

오약순기산 발효물의 성분 분석 및 뇌세포 보호 활성

원진배 · 마진열¹ · 양혜진 · 마충제*

강원대학교 생물소재공학전공, ¹한국한의학연구원

Neuroprotective Activity of Fermented Oyaksungisan

Jin Bae Weon, Jin Yeul Ma¹, Hye Jin Yang and Choong Je Ma*

Department of Biomaterials Engineering, Division of Bioscience and Biotechnology,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹TKM Converging Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Exporo, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

Abstract – Korean traditional prescription, Oyaksungisan was usually used to treat rheumatoid arthritis, paralysis. In this study, we compared the contents of five major components, ephedrine HCl, ferulic acid, hesperidin, 6-gingerol, glycyrrhizin and various unknown compounds in Ohyaksungisan (OY) with fermented Ohyaksungisan (FOY) by established HPLC-DAD method. The neuroprotective activity against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cell of OY and FOY was investigated by MTT assay. And anti-oxidative activity of OY and FOY was measured by DPPH radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical scavenging activity. After fermentation, contents of five major components and some unknown compounds (1), (2), (3) and (4) were increased in FOY. Also, FOY showed more potent neuroprotective activity. Furthermore, anti-oxidative activity of FOY was increased. In conclusion, the fermentation of OY could change contents various compounds and improved its neuroprotective activity.

Key words – Ohyaksungisan, Fermentation, Components, Neuroprotective activity, Anti-oxidative activity

최근 생활 수준의 향상과 의학의 발달과 더불어 개인의 평균 수명을 증가시켰다. 그러나 급격한 노령화로 인해 노화에 따른 각종 퇴행성 질환 발생이 증가하고 있다. 특히 치매와 같은 퇴행성 뇌신경계 질환은 사회적 문제로 대두되고 있다. 퇴행성 뇌신경 질환의 주된 원인이 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 축적에 의한 산화적 스트레스에 기인한다는 것이 보고되었다.¹⁻³⁾ Glutamate는 아미노산으로, 중추신경계에서 주요한 흥분성 신경전달물질이다. 과도한 glutamate의 농도는 N-acetyl cystein 흡수를 억제하여 산화적 스트레스를 유발시킨다.^{4,5)} HT22 cell은 마우스 해마 기원 세포주로서 glutamate로 유도된 뇌신경 질환의 기전을 연구하는 세포 모델로 사용되고 있다.^{6,7)}

한방제제는 예로부터 퇴행성 뇌 질환과 같이 다양한 종류의 질병에 대한 예방과 치료에 사용되었다. 사람의 몸에 적합하여 부작용이 적기 때문에 많이 이용되고 있다. 한방제제는 여러 가지 생약재로 구성되어 있기 때문에 다양한 효

능을 나타낼 수 있다. 한방제제중의 하나인 오약순기산은 마비, 뇌졸중과 류마티스 관절염 치료제로 사용되었다. 보고된 문헌에 따르면, 오약순기산의 물 추출물은 항 염증작용과 항 알러지작용을 한다.⁸⁾ 대한약전의한약(생약)규격집에 따르면 오약순기산은 마황(*Ephedra sinica*), 진피(*Citrus unshiu*), 오약(*Lindera strichnifolia*), 천궁(*Cnidium officinale*), 백지(*Angelica dahurica*), 백강잠 (*Bombyx mori*), 지각(*Citrus aurantium*), 길경(*Playtcodon grandiflorum*), 건강(*Zingiber officinale*), 감초(*Glycyrrhiza glabra*), 생강(*Zingiber officinale*) 그리고 대조(*Zizyphus jujube*) 로 구성 되어 있다.

발효와 같은 생물전환은 오약순기산과 같은 한방제제나 생약의 유효성분의 인체 내 흡수를 최대화하고 성분들의 효능을 극대화 시킬 수 있는 방법 중 하나 이다.⁹⁻¹¹⁾ 본 연구에서는 오약순기산을 유산균에 의해 발효시켰다. 지표성분의 함량 분석을 위해 생리활성 구성 약재 중 지표성분의 HPLC를 통한 개별적 정량 분석법이 확인된 마황(Ephedrine hydrochloride), 생강(6-gingerol), 감초(glycyrrhizin), 지각(hesperidin) 그리고 천궁(Ferulic acid) 을 선정하였다 (Fig. 1). 발효 전후의 지표성분의 함량과 다른 성분의 함량 변화

*교신저자 (E-mail): cjma@kangwon.ac.kr
(Tel): +82-33-250-6565

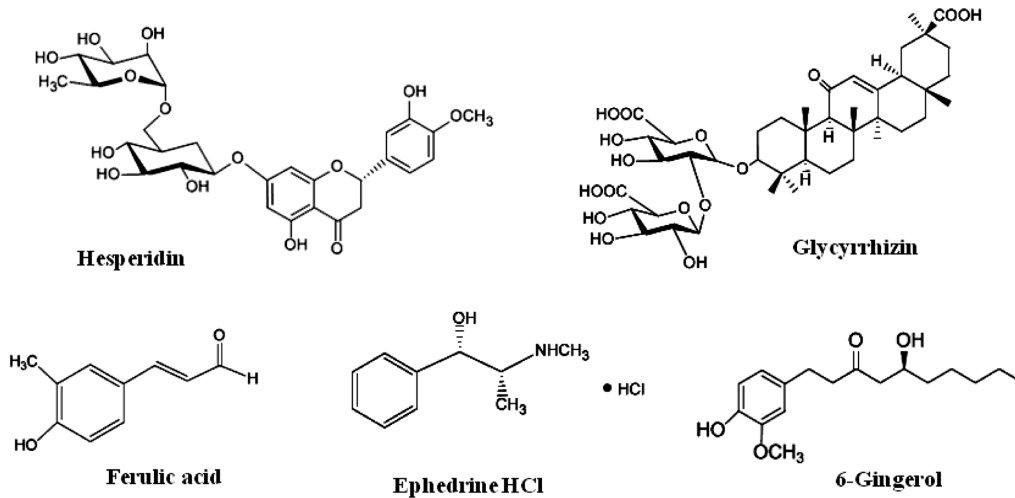


Fig. 1. Chemical structures of five marker constituents in Oyaksungisan.

를 확립된 HPLC 분석방법을 통해 비교 분석 하고 발효 전 후의 오약순기산의 glutamate에 유도된 산화적 스트레스로부터 뇌신경 세포 보호작용을 측정하고 비교하였다 또한 항산화 활성의 변화를 측정하고 뇌신경 세포 보호작용과의 관계를 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료 - 오약순기산은 한국한의학연구원에서 제공 받았다. HPLC 분석을 위한 용매는 HPLC급 시약을 사용하였다. 분석에 사용된 표준품 중 ferulic acid는 Sigma(USA)로부터 구입하였으며, ephedrine HCl, 6-gingerol, glycyrrhizin, hesperidin는 식품의약품안전청으로부터 구입하였다. 각 표준 물질의 순도는 98% 이상을 나타냈다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL, Co.로부터 구입하였다. Glutamate와 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(trolox), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), 2,2-azinobis(3-ethylbenthiazolin)-6-sulfonicacid(ABTS), 2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl(DPPH)는 Sigma(U.S.A.)로부터 구입하였다.

오약순기산 제조 - 오약순기산은 전탕 추출법에 의한 조제를 실시하였다. 각 한약재들은 마황 6g, 진피 6g, 오약 6g, 천궁 6g, 백지 4g, 백강잠 4g, 지각 4g, 길경 4g, 건강 2g, 감초 1.2, 생강 3쪽, 대추 2개를 무게의 10배에 해당하는 생수에 넣어 1시간 침적시킨 후 180분 열탕 추출하였다.

오약순기산 발효 - 오약순기산 물 추출물은 1 M NaOH을 이용하여 전체의 pH를 8.0으로 조절한 후, 121°C에서 15분간 가압멸균한 다음, 유산균을 접종하였다. 발효를 위해 균주로 사용된 *Lactobacillus acidophilus* KFRI 128은 한국

식품연구원에서 분양 받았다. 발효 전, 균주는 MRS broth 배지에서 24시간 동안 37°C 조건하에서 2회 계대 배양한 후 같은 배양 조건에서 배양액을 배지에 접종하였다. 희석을 통해 초기균을 1-5 × 10⁷ CFU/ml로 맞춘 후 7.5 ml의 균주를 750 ml의 멸균된 오약순기산에 접종하여 48시간 동안 37°C에서 배양하였다.

발효 전후 오약순기산 성분분석 - HPLC는 Dionex사의 시스템을 사용하였고, 시스템은 pump(LPG 3X00), auto sampler(ACC-3000), column oven(TCC-3000SD), diode array UV/VIS detector(DAD-3000(RS))로 구성 되어있다. 분석은 35°C에서 LUNA C18 column(5 μm, 250 × 4.60 mm)을 통해 수행하였다. 이동상은 HPLC 분석용 water와 methanol을 이용하였고, flow rate는 1.0 ml/min으로 하였다. 이동상 조건은 Table I에 제시되어 있다. UV wavelength는 각 지표성분의 최대 UV흡수 파장 값을 고려하여 ephedrine HCl는 207 nm, hesperidin 과 6-gingerol는 250 nm, glycyrrhizin는 280 nm 그리고 Ferulic acid는 320 nm로 설정하여 해당되는 파장에서 각 지표성분의 peak area를 측정하였다. 시료는 OY와 FOY의 무게를 정확히 측정한 후, 60% methanol

Table I. Gradient condition of mobile phase for chromatographic separation

Time (min)	0.1% TFA Water (%)	MeOH (%)	Flow rate (ml/min)
0	80	20	1.0
10	80	20	1.0
15	65	35	1.0
30	50	50	1.0
40	35	65	1.0
50	35	65	1.0
60	30	70	1.0

에 녹여 10 mg/ml로 하였다. HPLC 분석 전 0.45 µm filter 로 여과한 후, 20 µl 주입하여 분석하였다.

HT22 세포배양 및 뇌세포 보호 활성 측정 - 생쥐 해마 유래 세포주인 HT22 세포는 서울대학교로부터 분양하여 사용하였다. HT22 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO₂ 배양기 내에서 37°C에서 배양하였다. Glutamate로 유발된 독성에 대한 뇌세포 보호 활성을 측정하고자 MTT assay를 시행하였다. HT22 세포를 48-well plate에 6.7 × 10⁴ cells/300 µl를 분주하여 24 시간 배양한 후 시료, Trolox(positive control) 와 glutamate를 첨가한 후 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 MTT assay를 시행하였다. 뇌세포 보호 활성은 relative protection(%)로 나타냈다. 통계처리는 ANOVA test를 적용하였다.

DPPH Free Radical 소거 활성 측정 - 메탄올에 각 시료를 녹여 단계 희석된 희석액(150 µl)에 메탄올에 녹인 0.4 mM DPPH 용액(150 µl)을 가하여 실온의 암실에 방치한다. 30분 후 517 nm에서의 흡광도 측정하였다. 항산화제인 L-ascorbic acid는 positive control으로 사용되었다.

Hydrogen Peroxide 소거 활성 측정 - 96 well micro plate에 물에 의해 단계 희석된 시료(80 µl), 0.1 M phosphate buffer(pH 5.0, 100 µl)를 넣고 10 mM H₂O₂(20 l)를 가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 그 후에 1.25 mM ABTS(30 µl)와 1 U/ml peroxide -ase(30 µl)를 첨가하여 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hydroxyl radical 소거 활성 측정 - 10 mM FeSO₄·7H₂O (200 µl), 10 mM EDTA(200 µl), 10 mM 2-deoxyribose (200 µl)을 혼합한 혼합물을 물에 녹여 단계 희석된 시료 (200 µl)와 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 총량을 1.8 ml로 하고 H₂O₂(200 µl)를 첨가 후 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다. 반응 후, 2.8% TCA (1 ml)과 0.1% TBA (1 ml)의 혼합액에 첨가한 후 더운 물에 10분간 유지시킨 후, 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

발효 전후 오약순기산 성분분석 - 발효 전후의 오약순기

Table II. Contents of five marker compounds in the OY and FOY

	Content (µg/mg)				
	Ephedrine HCl	Ferulic acid	Hesperidin	6-Gingerol	Glycyrrhizin
OY	3.17±0.612	0.54±0.026	2.32±0.025	0.18±0.003	1.137±0.010
FOY	3.02±0.083**	0.45±0.001***	2.17±0.006***	0.11±0.011**	1.05±0.013

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. OY (ANOVA)

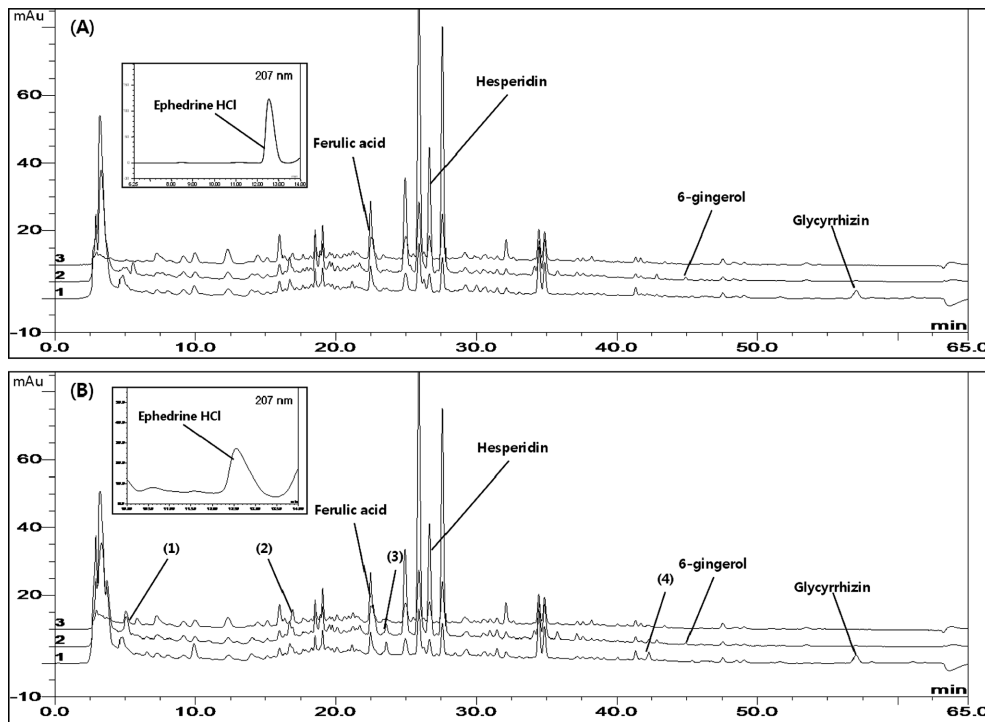


Fig. 2. The HPLC chromatogram of OY (A) and FOY (B). (1 = 250 nm, 2 = 280 nm, 3 = 320 nm)

산의 생리활성 성분의 변화를 분석하기 위해 확립된 HPLC-DAD 동시분석법을 이용하였다. 오약순기산 (Ohyaksungisan, OY)와 발효된 오약순기산 (fermented Ohyaksungisan, FOY)의 5가지 지표성분의 함량 분석 결과는 Table II에 나타내었다. FOY의 지표성분의 함량이 OY의 지표성분의 함량보다 4.98~37.94% 감소하였다. OY와 FOY성분에 대한 HPLC chromatogram를 확인해 보면 다양한 성분들 중에 FOY에서 Unknown compounds (1), (2), (3), (4)의 성분이 증가한 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2).

HT22 세포배양 및 뇌신경 세포보호 활성 측정 - OY와 FOY의 glutamate로 유발한 독성에 의한 HT22 cell에 대한 보호 활성을 검색하였다. OY는 10 µg/ml과 100 µg/ml에서 각각 7.95%와 16.20%의 세포 보호 활성을 나타내었고 FOY는 10 µg/ml과 100 µg/ml에서 각각 23.31%와 16.26%의 세포 보호 활성을 나타내었다. 비교 결과, 10 µg/ml에서 199.50%와 100 µg/ml에서는 0.37%의 증가율을 보였다. FOY의 뇌 세포보호 활성이 OY의 뇌세포 보호 활성보다 활성을 높인 것을 확인하였다 (Fig. 3).

항산화 활성 측정 - 항산화 활성을 비교 측정하기 위해 DPPH radical 소거 활성, hydrogen peroxide 소거 활성 그리고 hydroxyl radical 소거 활성을 측정하였다. 비교 측정 결과, DPPH radical 소거 활성과 hydrogen peroxide 소거 활성 측정에서는 FOY가 OY보다 약간의 활성 증가를 나타내었다. Hydroxyl radical 소거 활성의 경우, FOY가 OY에 비해 강한 활성을 보였다. 전체적으로 발효 후 항산화 활성

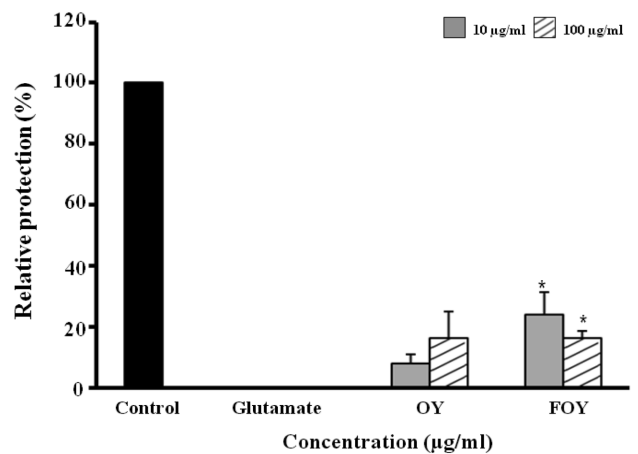


Fig. 3. The neuroprotective effects of OY and FOY on glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells. HT22 cells were treated with 10 and 100 µg/ml of OY and FOY then incubated for 24 h with glutamate (2 mM). Positive control, trolox (50 µM) exhibited relative protective activity (95.64 ± 8.19%). Each bar represents the mean ± SD of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. OY (ANOVA)

이 높아진 것을 확인 할 수 있었다 (Fig 4).

결론

본 연구에서 오약순기산을 유산균, *Lactobacillus acidophilus* KFRI 128을 이용하여 발효시킨 후, 발효 전후의 성분변화,

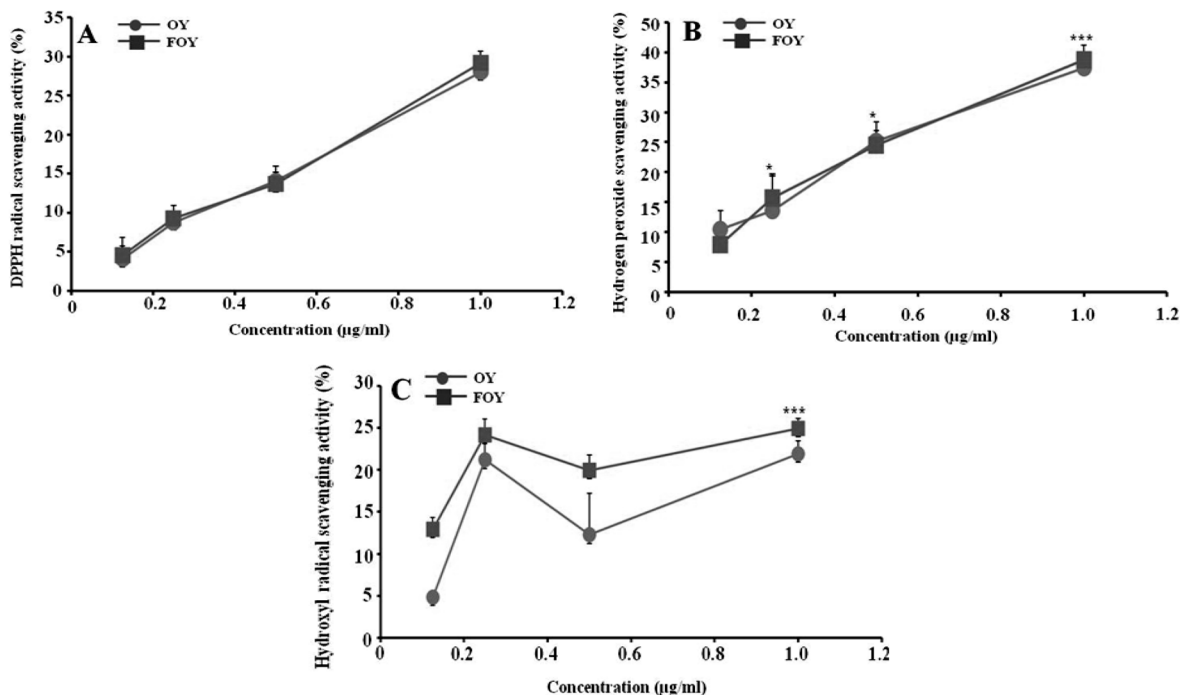


Fig. 4. Anti-oxidant activities of OY and FOY. (A) DPPH radical scavenging activity, (B) Hydrogen peroxide scavenging activity, (C) hydroxyl radical scavenging activity. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. OY (ANOVA)

뇌신경 세포보호 활성과 항산화 활성의 차이를 비교 분석하였다. HPLC-DAD을 통해 발효 전후의 오약순기산을 분석한 결과, 5가지 지표성분인 ephedrine HCl, ferulic acid, hesperidin, 6-gingerol, glycyrrhizin 함량이 감소하였고 다른 성분의 경우, unknown compounds인 (1), (2), (3), (4)의 함량이 증가하였다. 발효 전후의 뇌신경 세포보호 활성과 항산화 활성을 비교 분석한 결과에서 발효 시킨 오약순기산의 뇌세포 세포보호 활성이 발효 전보다 증가하였으며 항산화 활성도 증가하였다. 결론적으로 발효에 의한 오약순기산의 생리활성 성분 변화가 뇌신경 세포보호 활성과 항산화 활성의 향상에 기여한 것으로 판단된다. 또한 항산화 활성을 결과를 통해 오약순기산의 뇌신경 세포보호 활성이 HT22 cell에서의 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸과 관련이 있는 것으로 추정된다. 향후 발효 전후의 전환 또는 생성되는 새로운 물질의 정확한 규명과 함께 발효 전후의 활성변화에 관한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원 (K09040)에 의하여 수행되었음.

인용문헌

1. Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**: 689-695.
2. Satoh, T., Enokido, Y., Kubo, T., Yamada, M. and Hatanaka, H. (1998) Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **18**(6): 649-666.
3. Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A. and Markesbery, W. R. (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**(23): 10540-10543.
4. Choi, D. W. (1998) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* **1**: 623-634.
5. Davis, J. B. and Maher, P. (1994) Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* **652**(1): 169-173.
6. Braun, S., Liebetrau, W., Berning, B. and Behl, C. (2000) Dexamethasone-enhanced sensitivity of mouse hippocampal HT22 cells for oxidative stress is associated with the suppression of nuclear factor-kappaB. *Neurosci. Lett.* **295**(3): 101-104.
7. Liu, J., Li, L. and Suo, W. Z. (2009) HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* **84**(9-10): 267-271.
8. Lee, D. I., Lee, S. Y. and Moon, Y. H. (1966) Studies on the Anti-inflammatory and Analgesic Activities of Ohyaksung-isan. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**: 184-189.
9. Hyon, J.-S., Kang, S.-M., Han, S.-W., Kang, M.-C., Oh, M.-C., Oh, C.-K., Kim, D.-W., Jeon, Y.-J. and Kim, S.-H. (2009) Flavonoid Component Changes and Antioxidant Activities of Fermented *Citrus grandis* Osbeck Peel. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**(10): 1310-1316.
10. Cha, J.-Y., Yang, H.-J., Jeong, J.-J., Seo, W.-S., Park, J.-S., Ok, M. and Cho, Y.-S. (2010) Tyrosinase Inhibition Activity and Antioxidant Capacity by Fermented Products of Some Medicinal Plants. *J. Life Sci.* **20**(6): 940-947.
11. Doh, E.-S., Chang, J.-P., Lee, K.-H. and Seong, N.-S. (2010) Ginsenoside Change and Antioxidation Activity of Fermented Ginseng. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **18**(4): 255- 265.

(2010. 12. 2 접수; 2011. 1. 20 심사; 2011. 1. 20 게재확정)