

Neuronal Cell Protection and Antioxidant Activities of Hot Water Extract from Commercial Buckwheat Tea

Chang-Ho Jeong¹, Hee Rok Jeong², Sung-Gil Choi²,
Ki-Hwan Shim² and Ho Jin Heo^{2*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Institute of Life Science and Resources,
Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

²Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

시판 메밀차 열수 추출물의 항산화 및 신경세포 보호효과

정창호¹ · 정희록² · 최성길² · 심기환² · 허호진^{2*}

¹경희대학교 식품공학과

²경상대학교 식품공학과 · 농업생명과학연구원

Abstract

The antioxidant and neuronal cell-protective effects of hot water extract from commercial buckwheat tea (CBTE) were evaluated. The 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and malondialdehyde (MDA) inhibitory effect of the CBTE increased in a dose-dependent manner. The Intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation that resulted from hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment more significantly decreased when CBTE was present in the media than when the PC12 cells were treated only with H₂O₂. In the neuronal cell viability assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), the aqueous extracts showed a protective effect against H₂O₂-induced neurotoxicity, and the lactate dehydrogenase (LDH) release into the medium was also inhibited by CBTE. The total phenolics of CBTE was 9,608.10 mg/100 g, and the major phenolic compounds were rutin (13.42 mg/100 g) and quercitrin (0.90 mg/100 g). These data suggested that CBTE, including the aforementioned phenolics, may be useful in reducing the risk of neurodegenerative disease.

Key words : Commercial buckwheat tea, rutin, antioxidant, neuronal cell protection

서 론

현대 사회의 눈부신 발달과 더불어 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환이 사회적인 문제로까지 크게 대두되고 있다. 특히 이러한 질환의 주된 원인이 활성산소(free radical, oxygen radical)에 기인한다는 것이 인정됨(1-2)에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 천연 항산화제에 대한 연구와 개발이 활발히 진행되고 있다(3-4). Superoxide anion radical, hydroxy radical, singlet oxygen 및 H₂O₂ 등과 같은 활성산소들은 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에

서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되며(5), 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(6). 퇴행성 신경질환의 대부분을 차지하는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease; AD)은 기억과 인지에 손실을 주는 특징을 가지고 있으며, AD환자의 뇌에서 free radical과 같은 산화적 스트레스로 인한 뇌신경세포들의 기능장애가 AD와 같은 퇴행성 신경질환의 원인으로 알려져 있다(7). 알츠하이머 질환은 노년층에서 흔히 발생하는 퇴행성 신경질환으로 한국의 경우, 노인 인구 증가에 따라 2020년 까지 65세 이상 노인 인구의 약 8.3%인 62만 명이 알츠하이머 환자가 될 것으로 추정하

*Corresponding author. E-mail : hjher@gnu.ac.kr
Phone : 82-55-772-1907, Fax : 82-55-772-1909

고 있다(8). 퇴행성 신경 질환의 대표적인 치료방법으로는 항산화제 처리, 세포 이식 및 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만, 대부분의 치료법이 여러 가지 위험요소, 부작용 및 손상 기전의 복잡성 등으로 인하여 신경세포의 손상 보호에 적합한 치료제는 아직까지 개발되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 안전성이 입증된 다양한 식품과 천연자원으로부터 보다 안전하고 신경세포 보호효과가 뛰어난 치료 및 예방 효과를 나타낼 수 있는 화합물들의 개발이 절실히 요구되고 있다(9).

메밀(*Fagopyrum esculentum*)은 마디풀과에 속하는 일년 초로서 분류학상 곡류와는 구별되지만 곡류와 유사한 특성을 지니고 있다(10). 메밀은 탄수화물 식품이지만 lysine, arginine 및 leucine 등 필수아미노산을 많이 함유하고 있으며, 다른 곡류에 비하여 영양학적으로 우수한 아미노산 조성을 가지고 있다(11). 또한 메밀에는 모세혈관의 투과성을 향상시키는 rutin과 당뇨병의 안구압에 관여하는 quercetin과 같은 flavonoid계 성분이 함유되어 있으며(12), 다른 곡류에 비하여 수용성 식이섬유의 함량이 높다(13).

지금까지 메밀에 대한 연구로는 메밀가루를 첨가한 식빵의 품질특성(14), 항당뇨(15), 항산화(16), angiotensin I-변환 효소 저해활성(17), DNA 손상 보호 효과(18), 항균활성 및 세포독성(19), 돌연변이 억제효과(20), xanthine oxidase 저해 활성(21) 및 α -amylase 효소 활성 저해(22) 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 시판 메밀차 열수 추출물의 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과와 같은 퇴행성 뇌신경질환에 관한 연구는 미비한 실정이다. Pheochromocytoma 12 (PC12) 세포는 rat 부신수질 갈색세포종양에서 유래된 세포로서, 신경세포의 기능을 해석하기 위해서 많이 사용되고 있으며, 시냅신 등의 신경계 특이적인 분비관련 단백질을 발현하고 있어, 신경전달물질 방출의 제어기구의 해석에도 적합한 모델로 사용되고 있다(23).

따라서 본 연구에서는 산화적 스트레스로부터 유도되는 신경세포의 사멸을 보호할 수 있는 생리활성물질을 탐색하기 위한 목적으로 시판 메밀차 열수 추출물을 이용하여 항산화 활성 및 H_2O_2 와 같은 산화적 스트레스 의해 손상된 PC12 신경세포에 대한 보호효과를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물의 제조

본 실험에 사용된 메밀차는 2011년 1월 진주시내에 위치한 대형마트에서 구입하여 냉장보관(4°C)하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 시약으로 RPMI 1640 medium과 fetal bovine serum은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, 2,4,6-trip-tyridyl-S-triazine (TPTZ) solution, 2,2'-azino-

bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonicacid) diamm- onium salt (ABTS), hydrogen peroxide (H_2O_2) solution, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay kit, Lactate dehydrogenase (LDH) release assay kit, penicillin, streptomycin, sodium bicarbonate, {4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid} (HEPES), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 및 나머지 시약은 Sigma Co(St Louis, MO, USA)제품을 구입하여 사용하였고, 그 외 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다. 시판 메밀차 열수 추출물은 시료 10 g에 증류수 200 mL를 첨가하여 100°C에서 2시간 동안 추출 후 No 2 여과지(Whatman plc., Kent, UK)로 여과하였다. 그 후 진공농축기(N-N series, EYELA Co, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조(IIShin Lab Co, Ltd, Yangju, Korea)하여 사용하였고, 동결 건조된 추출물은 -20°C 냉동고에서 보관하면서 본 실험에 사용하였으며, 추출수율은 14.91%였다.

총 페놀성 화합물 및 phenolics 함량 분석

추출물 1 mL에 3차 증류수 9 mL를 첨가한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 넣고 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응용액에 7% Na_2CO_3 용액 10 mL를 넣어 다시 혼합한 다음 3차 증류수로 25 mL로 정용하였다. 이 혼합 용액을 23°C에서 2시간 동안 정치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 작성된 검량선으로 총 페놀화합물 함량을 계산하였다(24). 시판 메밀차 열수 추출물에 함유되어 있는 phenolics 분석은 HPLC (Ultra mate 3000, Dionex Co, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 조건 중 column은 Shiseido C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 이동상은 0.01 M potassium phosphate monobasic pH 3.0 (A)와 methanol (B)을 사용하였으며, 0~80% B 용매를 linear gradient로 30분 동안 분석하였다. 유속은 1.5 mL/min, 주입량은 20 μ L, 검출기는 photo diode array detector 및 파장은 280 nm에서 분석하였다.

2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 소거활성

7 mM ABTS 5 mL와 140 mM $K_2S_2O_8$ 88 μ L를 섞어 어두운 곳에 14~16시간 방치시킨 후, 이를 무수 에탄올과 약 1 : 88(v/v) 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7 ± 0.02 가 되도록 조절한 ABTS 용액을 사용하였다. 시료용액 50 μ L와 ABTS 용액 1 mL를 혼합하여 30초간 진탕한 후 2.5분간 반응시키고, 734 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거활성을 나타내었다(25).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 분석

FRAP 분석에 사용된 시약은 0.3 M sodium acetate buffer

(pH 3.6)와 40 mM HCl로 용해시킨 10 mM TPTZ 용액, 그리고 20 mM FeCl₃ 용액을 사용하였다. 미리 제조된 sodium acetate buffer, TPTZ solution 및 FeCl₃ 용액을 각각 10 : 1 : 1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 10~15분간 incubation 시켜 FRAP reagent를 준비하였다. FRAP 시약 1.5 mL를 추출물 50 µL에 혼합하여 vortex하여 실온에서 30분간 방치한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다(26).

지질의 과산화 억제활성

뇌 조직을 이용한 지질과산화 생성물인 malondialdehyde (MDA) 생성 억제활성측정은 Chang 등의 방법(27)을 변형하여 사용하였다. 무게 200~300 g의 Sprague-Dawley계열 흰쥐를 에테르로 마취시킨 다음 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌 조직에 10 volume의 ice cold Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.4)에 균질화시킨 후 4°C에서 15분간 12,000 g으로 원심 분리하였다. 상등액 0.1 mL에 10 µM FeSO₄ 0.1 mL, 0.1 mM ascorbic acid 0.1 mL 및 시료 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이 반응액에 28% trichloroacetic acid 0.1 mL를 첨가하여 반응을 종결시키고, 1% thiobarbituric acid 0.3 mL를 첨가하여 80°C에서 30분간 가열한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 및 배양방법

본 실험에서 사용한 PC12 세포 (KCLB 21721, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 신경세포의 특성을 나타내는 세포로 쥐의 pheochromocytoma로부터 유도된 것을 사용하였다. PC12 세포를 25 mM HEPES, 25 mM sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 분석

시판 메밀차 열수 추출물이 H₂O₂에 의한 PC12 세포의 산화적 스트레스 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA 분석을 실시하였다. 먼저 세포를 96 well plate에 2×10⁶ cells/well로 분주하고, 시판 메밀차 열수 추출물 추출물을 농도별로 처리한 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음, phosphate buffered saline (PBS) buffer로 세척한 다음 200 µM H₂O₂를 가하고, 3시간 배양한 후 50 µM DCFH-DA를 가하고, fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co, San Jose, CA, USA)를 사용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다(28).

세포 생존율 측정

H₂O₂에 의해 유도된 PC12 세포에 대한 보호효과는 MTT

reduction 분석법으로 측정하였다. 시판 메밀차 열수 추출물을 PC12 cell에 처리하여 48시간동안 전 배양 시킨 후, 200 µM H₂O₂를 각각 3시간 동안 처리하였다. 이 상태의 PC12 cell에 MTT stock 용액을 처리하여 37°C에서 3시간 배양시킨 후, MTT solubilization solution 150 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 흡광도는 microplate reader (680, Bio-rad, Tokyo, Japan)에서 570 nm (determination)와 690 nm (reference wave)에서 측정하였다. Positive control은 vitamin C (200 µM)를 사용하였고, cell viability는 control group에 대한 % concentration으로 나타났다.

세포막 손상 억제효과

시료를 첨가하여 48시간동안 전 배양시킨 후, 200 µM H₂O₂를 처리하여 3시간 배양한 후, 5분간 원심분리(250 × g)하여 100 µL의 상등액을 새로운 well로 옮긴 후 LDH assay kit (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)를 사용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하여 mean ± SD로 나타내었으며, 각 평균값에 대한 검증은 SAS (Statistical Analysis System, ver. 6.12)를 이용하여 평균과 표준오차, Newman-Keul's multiple range tests로 평균값들에 대해 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

총 페놀성 화합물 및 phenolics 함량 분석

시판 메밀차 열수 추출물에 함유되어있는 페놀성 화합물은 천연물에 많이 함유되어 있는 성분으로 이들의 주요 역할은 자유라디칼을 소거하는 것이라는 연구가 많이 보고되고 있으며, 이러한 페놀성 화합물인 플라보노이드나 페놀산 및 안토시아닌 등의 총량인 총 페놀성 화합물 함량은 DPPH 라디칼 소거활성과 같은 항산화 활성에 중요한 인자로 작용한다(29). 시판 메밀차 열수 추출물의 총 페놀성 화합물 함량 및 HPLC로 표준품을 이용하여 rutin과 quercitrin의 함량을 분석한 결과는 Fig. 5 및 Table 1과 같다. 메밀차 열수 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 9,608.10 mg/100 g이었으며, rutin과 quercitrin 함량은 각각 13.42와 0.90 mg/100 g이 함유되어 있는 것으로 나타났다 (Table 1). Maeng 등(30)은 메밀 종실가루의 rutin 함량이 100 g당 15.71~20.92 mg, 메밀쌀은 100 g당 15.04~17.49 mg, 시판 메밀국수는 100 g당 1.76~6.60 mg, 막국수는 100 g당 2.86~10.84 mg수준을 나타낸다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 보여주었다.

Table 1. Total phenolics, rutin and quercitrin contents of CBTE

	Contents (mg/100 g)
Total phenolics	9,608.10±104.13
Rutin	13.42±0.27
Quercitrin	0.90±0.03

Results shown are means±SD (n=3).

항산화 활성

시판 메밀차 열수 추출물을 이용하여 ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP 분석 결과는 Fig. 1A와 같다. ABTS 라디칼 소거활성 측정 결과 열수 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 보였으며, 농도 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL에서 각각 23.40, 36.30, 61.23 및 98.33%의 소거 활성을 보였고, IC₅₀값은 390 µg/mL로 나타났다. 그러나 positive control로 사용된 vitamin C보다는 모든 농도에서 낮은 활성을 나타내었다. Ya-ping 등(31)은 일반 메밀과 쓴 메밀 에탄올 추출물을 이용하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성 역시 증가하는 경향을 보였으며, 일반 메밀보다 쓴 메밀 에탄올 추출물에서 높은 DPPH 라디

칼 소거활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 DPPH 라디칼 소거활성물질을 HPLC와 MS를 이용하여 분석한 결과 rutin과 quercetin이 주요 화합물인 것으로 보고하였다.

또 다른 항산화 실험인 FRAP assay는 시료 내에 존재하는 항산화제에 의해 ferric ion이 ferrous ion으로 환원됨으로써 얻어지는 colored ferrous tripyridyl triazine complex를 593 nm에서 흡광도를 측정함으로써 항산화력을 측정하는 방법이다(26). 시판 메밀차 열수 추출물의 FRAP 분석 결과는 Fig. 1B에서 보는 바와 같이 ABTS 라디칼 소거활성과 유사하게 추출물의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 농도 의존적으로 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 양성 대조군으로 사용한 vitamin C와 비교하였을 때 매우 낮은 흡광도를 나타내었다. Tang 등(32)은 메밀 효소 분해물을 이용하여 환원력을 측정한 결과 효소 분해 시간에 다소 차이는 보였지만 농도 의존적으로 환원력이 증가하였으며, 이는 폴리페놀성 화합물의 함량과 매우 높은 상관관계를 가지는 것으로 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. Osawa(33)는 식물로부터 추출된 페놀성 화합물은 항산화능을 포함한 다양한 생물학적 효능을 나타낸다고 보고하였으며 이들의 효능은 주로 산화·환원력에 의한 것이라고 보고하였다. 따라서 본 실험 결과에서 시판 메밀차 열수 추출물의 항산화 활성이 농도 의존적으로 증가한 것은 추출물에 함유되어 있는 rutin 및 quercitrin과 같은 페놀성 화합물이 산화·환원력에 의해 유리 라디칼을 소거하는 것이라고 판단된다.

뇌 조직을 이용한 지질의 과산화 억제활성

본 연구에서는 유해 활성산소에 의한 뇌세포의 산화적 손상에 있어서 시판 메밀차 열수 추출물에 의한 지질 과산화 억제 효과를 분석하였는데, 이는 뇌세포가 다른 장기에 비하여 특히 불포화 지방산의 함량이 높은 관계로 산화적 손상의 변화를 조사하기가 유리하고, 지질성분의 산화가 세포막 손상 및 기타 단백질 손상(34)과도 관계가 깊어 본 연구를 진행하였다. 시판 메밀차 열수 추출물을 이용한 지질 과산화 억제 활성은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 추출물의 농도가 증가함에 따라 저해 활성이 증가하는 것으로 나타났고, 특히 100 µg/mL에서는 73.37%로 양성대조군으로 사용된 catechin 75.30%와 유사한 활성을 보여주어 뛰어난 지질 과산화 방지 효과가 있는 것으로 나타났다. 체내에서 생성된 지질과산화물인 MDA가 단백질과 결합하여 세포변이, 세포막의 파괴 및 노화, 암 유발 가능성, 퇴행성 변화와 같은 생체에 해로운 영향을 미치는데(35), Kwak 등(20)은 한국산 메밀, 수수, 기장, 울무 에탄올 추출물을 이용하여 MDA와 BSA (bovin serum albumin)와의 결합 억제효과를 측정한 결과 4가지 시료 모두 처리 농도가 높아질수록 농도 의존적으로 MDA와 BSA의 결합으로 인하여 생성된 band가 감소되는 것을 알 수 있었고, 또한 메밀이 가장 우수한

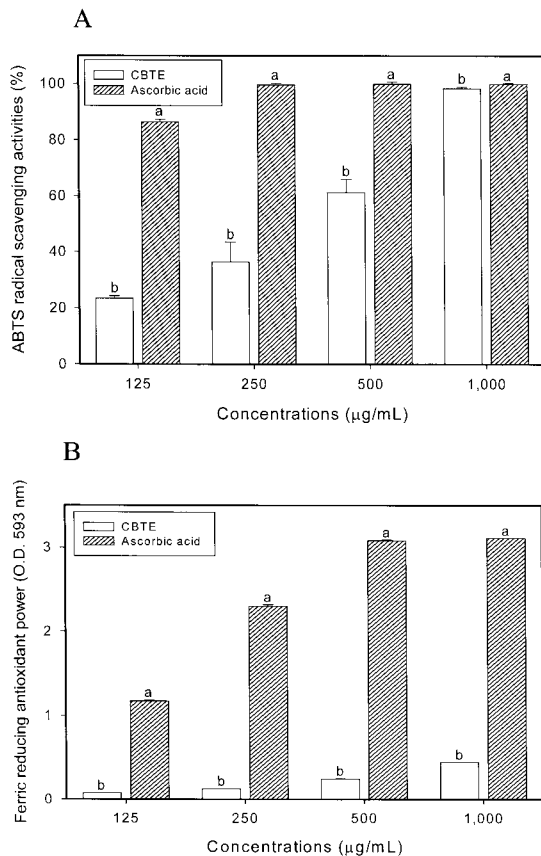


Fig. 1. ABTS (A) radical scavenging activities and FRAP (B) of CBTE.

Results are presented as the mean±SD of 3 independent experiments in triplicate. Different letters are significantly different at $p < 0.05$.

효과를 나타내었다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보였다.

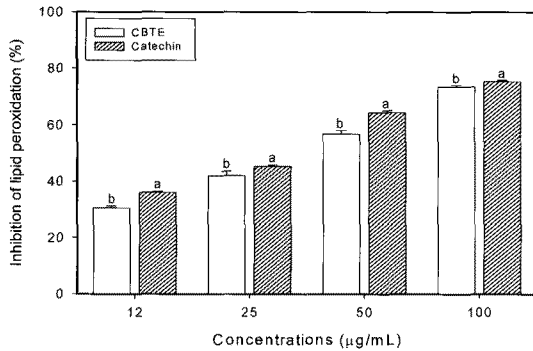


Fig. 2. Malondialdehyde assay of CBTE on both ferric ion and ascorbic acid- induced lipid peroxidation.

Results are presented as the mean±SD of 3 independent experiments in triplicate. Different letters are significantly different at p<0.05.

PC12 세포의 산화적 손상에 대한 보호효과

H₂O₂에 의해 PC12 세포의 산화적 스트레스를 유발한 후 PC12 세포 보호효과를 DCF-DA 분석을 통하여 검토하였다. 먼저 PC12 세포에 농도별 시판 메밀차 열수 추출물을 전처리한 다음, H₂O₂로 세포의 산화적 스트레스를 유발하여 DCF fluorescence strength를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 그 결과 잘 알려진 산화제이고 DCF에 의해 직접적으로 포집되는 H₂O₂를 단독 처리한 군에서는 217.27%로 대조군 100% 대비 약 117%의 형광강도 증가를 보인 반면, 시판 메밀차 열수 추출물 5, 50 및 400 µg/mL를 처리한 시료에서는 각각 213.92%, 142.28% 및 110.52%로 농도 의존적인 산화적 스트레스에 의한 보호 효과를 나타내었다. Choi 등 (36)은 가시오가피 80% 메탄올 추출물을 이용하여 PC12 cell에 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발한 후 DCF-DA 방법으로 산화적 손상 보호효과를 측정된 결과 H₂O₂ 단독 처리

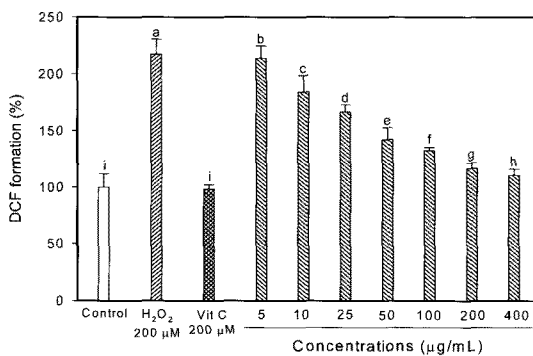


Fig. 3. Effect of CBTE on ROS production determined in the presence and absence of H₂O₂ in PC12 cell.

Results are presented as the mean±SD of 3 independent experiments in triplicate. Different letters are significantly different at p<0.05.

구에서는 407.85%의 ROS 증가량을 보인 반면 가시오가피 추출물 처리구에서는 농도 의존적인 산화적 손상 보호 효과를 보였으며, 이는 가시오가피 추출물에 함유되어 있는 페놀성 화합물에 의한 것으로 보고하였으며, Jeong 등(37)도 청국장 메탄올 추출물을 이용하여 PC12 cell에 산화적 스트레스 유발 보호효과를 측정된 결과 폴리페놀성 화합물에 의한 산화적 손상 보호효과인 것으로 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

신경세포 보호효과 및 세포막 손상 보호효과

시판 메밀차 열수 추출물의 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC12 신경세포에 대한 보호 효과를 측정된 결과는 Fig. 4A와 같다. 세포 생존율은 H₂O₂를 처리한 처리구에서는 대조군 100% 대비 70%의 생존율을 나타냈고, vitamin C를 처리한 군에서는 110%의 생존율로 약 40%정도의 신경세포 보호효과를 나타내었다. 시판 메밀차 열수 추출물 100 및 200 µg/mL를 처리한 시료에서는 각각 93 및 94%의 생존율을 보였으며, 400 µg/mL 처리구에서는 102%로 시판 메밀차 열수 추출물에서 농도 의존적인 신경세포 보호효과를 나타내었다. Jeong 등(38)은 초피나무 잎

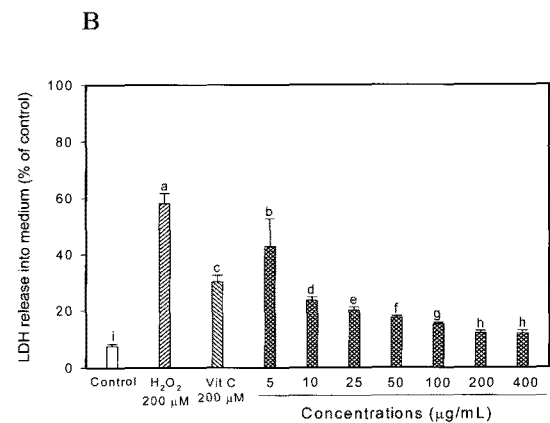
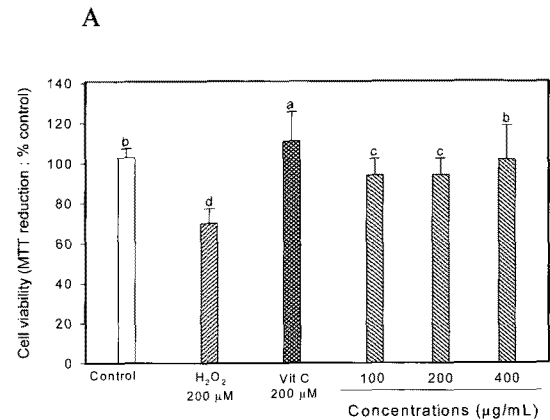


Fig. 4. Neuroprotective effect of CBTE on H₂O₂-induced cell death (A) and membrane damage (B) in PC12 cell.

Cell viability was not changed by vitamin C or the phenolics (data not shown). Results shown are means±SD (n=3). Significant difference (p<0.05 vs. vitamin C) was observed on the H₂O₂-induced cell death.

메탄올 추출물로부터 column chromatography를 실시하여 얻은 fraction을 이용하여 항산화 및 신경세포 보호효과를 조사한 결과 페놀성 화합물의 함량이 높았던 fraction 4에서 높은 항산화 및 신경세포 보호효과를 보였고, 또한 HPLC를 이용하여 표준품과 비교, 분석한 결과 quercetin, quercitrin, afzelin 및 hyperin으로 보고함에 따라 본 실험의 연구결과와 유사하게 시판 메밀 열수 추출물의 항산화 및 신경세포 보호효과도 이에 함유되어 있는 페놀성 화합물 등에 의한 것으로 판단된다.

신경세포의 경우 상대적으로 많은 lipid 성분을 함유하고 있고 이는 산화적인 스트레스에 매우 취약하기 때문에 이러한 구조적 특성을 이용하여 상기의 신경세포 보호효과와 신경세포막 손상과의 관계를 알아보하고자 다음의 연구를 추가 진행하였다. H_2O_2 로 유도된 신경세포막 손상에 대한 시판 메밀차 열수 추출물의 보호효과를 확인하기 위하여 신경세포 중에 함유되어 있는 세포질 성분의 LDH 방출량을 측정된 결과는 Fig. 4B와 같다. Control group의 방출량은 7.6% 정도인데 반해 H_2O_2 처리한 구에서는 58%의 방출량을 보여 H_2O_2 로 인해 LDH 방출량이 50%정도 증가하였다. Vitamin C 200 μ M 처리군은 30%의 LDH 방출량을 보였고, 시판 메밀차 열수 추출물 6.25 μ g/mL의 농도로 처리했을 때는 43%의 LDH 방출량을 나타내어 H_2O_2 단독 처리구와 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않았으나 50, 100 및 200 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때는 각각 18, 15 및 12%의 LDH 방출량을 나타내어 농도 의존적으로 신경세포막의 손상 정도가 점차적으로 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 그러나 200 및 400 μ g/mL의 농도에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 시판 메밀차 열수 추출물에는 rutin 및 quercitrin 등의 항산화성 활성물질이 다량 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다.

따라서 시판 메밀차 열수 추출물에는 다양한 생리활성을 가지고 있는 rutin 및 quercitrin과 같은 phenolics가 다량 함유되어 있으므로 메밀을 활용한 고부가가치 가공식품

및 건강 기능성 식품 소재로서의 이용 가능성이 클 것으로 판단된다. 다만 소재로서의 가능성을 보다 구체화하기 위해서는 메밀 내에 존재하는 active compound를 이용하여 *in vivo* 실험과 분자생물학적인 mechanism을 밝히기 위한 노력도 추가적으로 진행되어야 할 것으로 판단된다. 위의 실험 결과를 종합하여 볼 때 시판 메밀차에서는 다양한 *in vitro* assay를 통하여 나타난 항산화 활성을 바탕으로 한 신경세포 보호효과를 토대로 퇴행성 뇌신경질환의 예방을 위한 식품으로서의 활용 가능성이 높다고 판단된다.

요 약

본 연구에서는 시판 메밀차 열수 추출물의 항산화 효과 및 신경세포 보호효과를 조사하였다. 시판 메밀차 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성, FRAP 및 MDA 생성 저해 실험결과 농도 의존적인 경향이 나타났으며 또한 높은 항산화 활성을 보여주었다. 과산화수소로 유발된 산화적 손상에 의한 ROS 축적량을 조사한 결과 H_2O_2 단독 처리구보다 메밀차 열수 추출물 처리구에서 낮은 ROS 축적량을 나타내었다. MTT 및 LDH 분석을 통한 PC12 세포 중의 신경세포 보호효과를 측정된 결과 MTT 분석에서는 시판 메밀차 열수 추출물의 모든 농도에서 높은 세포 생존율을 나타냈고, LDH 분석에서는 추출물에 의한 농도 의존적인 세포질 효소 (LDH) 방출량 감소가 관찰되었다. 총 페놀성 화합물, rutin 및 quercitrin의 함량은 각각 9,608.10 mg/g, 13.42 및 0.90 mg/100 g이었다. 본 연구결과를 종합해 볼 때 rutin 및 quercitrin과 같은 다양한 페놀성 화합물을 함유한 시판 메밀차 추출물은 항산화 활성과 산화적 스트레스로 유발된 신경세포 보호효과를 나타내어 퇴행성 신경질환 등을 예방할 수 있는 기능성 식품 소재로서의 활용 가치가 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 정부의 재원으로 한국연구재단(KRF-2008-521-F00074, NRF-2009-351-F00028) 및 지식경제부 지역산업 기술개발과제(경남-2009-70007068)의 지원을 받아 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Yoon MY, Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Lee MR, Jo KJ, Park HR (2007) Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindle. on H_2O_2 -

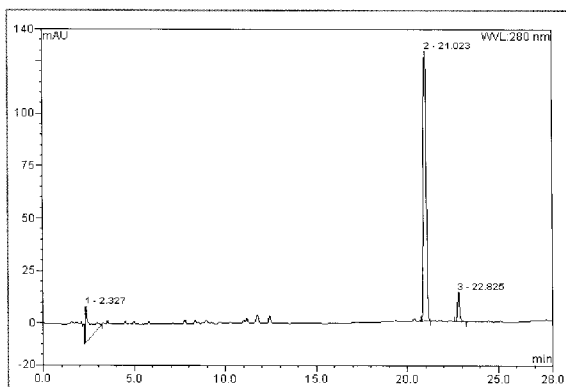


Fig. 5. HPLC chromatogram of CBTE.

Retention time on HPLC: Rutin; 21.02 min, Quercitrin; 22.82 min.

- induced neurotoxicity in PC12 cells. J Korean Soc Apple Biol Chem, 50, 63-67
2. Sagara Y, Dargusch R, Chambers D, Davis J, Schubert D, Mater P (1998) Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. Free Radic Biol Med, 24, 1375-1389
 3. Lee YS (2007) Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. Korean J Food Preserv, 14, 78-86
 4. Kim DJ, Seong KS, Kim DW, Ko SR, Chang CC (2004) Antioxidative effects of red ginseng saponins on paraquat-induced oxidative stress. J Ginseng Res, 28, 5-10
 5. Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science, 221, 1256-1264
 6. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidant, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc Natl Acad Sci, USA, 90, 7915-7922
 7. Heo HJ, Choi SJ, Choi SG, Shin DH, Lee JM, Lee CY (2008) Effects of banana, orange, and apple on oxidative stress-induced neurotoxicity in PC12 Cells. J Food Sci, 73, 28-32
 8. Eum HS, Kang EB, Lim YH, Lee JR, Cho IH, Kim YS, Chae KR, Hwang DY, Kwak YS, Oh YS, Cho JY (2008) The effect of exercise training on A β -42, BDNF, GLUT-1 and HSP-70 proteins in a NSE/ APPsw-transgenic model for Alzheimer's disease. J Life Sci, 18, 796-803
 9. Yoon MY, Lee BB, Kim JY, Kim YS, Park EJ, Lee SC, Park HR (2007) Antioxidant activity and neuroprotective effect of *Psoralea corylifolia* Linne Extracts. Kor J Pharmacogn, 38, 84-89
 10. Kim YS, Chung SH, Suh HJ (1994) Rutin and mineral contents on improved kinds of Korean buckwheat at growing stage. Korean J Food Sci Technol, 26, 759-763
 11. Yeshajahu P, George SR (1972) Amino acid composition of buckwheat. J Agric Food Chem, 20, 270-274
 12. Havsteen B (1983) Flavonoids a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem Pharm, 32, 1141-1148
 13. Lee JS, Son HS, Maeng YS, Chang YK, Ju JS (1994) Effects of buckwheat on organ weight, glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. Korean J Nutr, 27, 819-827
 14. Choi SN, Chung NY (2007) The quality characteristics of bread with added buckwheat powder. Korean J Food Cookery Sci, 23, 664-670
 15. Lee JS, Lee MH, Son HS, Mang YS (1996) Effects of buckwheat on the activities of pancreatic digestive enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr, 25, 831-838
 16. Zhang M, Chen H, Li J, Pei Y, Liang Y (2010) Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods. LWT-Food Sci Technol, 43, 181-185
 17. Li CH, Matsui T, Matsumoto K, Yamasaki R, Kawasaki T (2002) Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. Journal of Peptide Science, 8, 267-274
 18. Wei C, Wei-Jun C, Zhi-Rong S, Ya-Ping Y (2008) Protective effects of ethanolic extracts of buckwheat groats on DNA damage caused by hydroxyl radicals. Food Research International, 41, 924-929
 19. Hwang EJ, Lee SY, Kwon SJ, Park MH, Boo HO (2006) Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic activities of *Fagopyrum esculentum* Mönch extract in germinated seeds. Korean J Medicinal Crop Sci, 14, 1-7
 20. Kwak CS, Lim SJ, Kim SA, Park SC, Lee MS (2004) Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, sorghum, millet and job's tears. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 921-929
 21. Suh HJ, Chung SH, Kim YS, Lee SD (1997) Free radical scavenging activities and inhibitory effects on xanthine oxidase of buckwheat(Suwon No 5). J Korean Soc Food Sci Nutr, 26, 411-416
 22. Lee MH, Lee JS, Yang HC (2008) α -amylase inhibitory activity of flower and leaf extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 42-47
 23. Lee YS, Lee JH (2006) Screening of active substance FS11052 as an inhibitor of neurotransmitter release from PC12 cells. Korean J Vet Res, 46, 87-96
 24. Kim DO, Jeong SW, Lee CY (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemical from various cultivars of plums. Food Chem, 81, 321-326
 25. Pellegrin N, Re R, Yang M, Rice-Evans C (1998) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. Method Enzymol, 299, 379-389
 26. Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal Biochem, 239, 70-76

27. Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF (2001). Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem*, 49, 3420-3424
28. Heo HJ, Cho HY, Hong BS, Kim EK, Kim BK, Shin DH (2001) Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid*, 8, 194-201
29. Jeong CH, Choi SG, Heo HJ (2008) Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasa borealis* leaf tea. *Korean J Food Sci Technol*, 40, 586-592
30. Maeng YS, Park HK, Kwon TB (1990) Analysis of rutin contents in buckwheat and buckwheat food. *Korean J Food Sci Technol*, 22, 732-737
31. Ya-ping Y, Cheng-rui T, Wei C (2008) Anti-oxidative constituents of ethanol extract from buckwheat seeds by HPLC-electro-spray MS. *Agricultural Sciences in China*, 7, 356-362
32. Tang CH, Peng J, Zhen DW, Chen Z (2009) Physicochemical and antioxidant properties buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. *Food Chem*, 115, 672-678
33. Osawa T (1994) Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. pp. 241-251. In : Postharvest biochemistry of plant food-material in the tropics. Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM (ed). Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan
34. Uchida K, Stadtman ER (1993) Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem*, 268, 6388-6393
35. Colditz GA, Branch LG, Lipnick RJ, Willett WC, Rosner B, Posner BM, Hennekens CH (1985) Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *Am J Clin Nutr*, 41, 32-36
36. Choi SJ, Yoon KY, Choi SG, Kim DO, Oh SJ, Jun WJ, Shin DH, Cho SH, Heo HJ (2007) Protective effect of *Acanthopanax senticosus* on oxidative stress induced PC12 cell death. *Food Sci Biotechnol*, 16, 1035-1040
37. Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong HR, Heo HJ (2010) Neuronal cell protective effects of methanol extract from *Cheonggukjang* using *in vitro* system. *Korean J Food Sci Technol*, 42, 768-772
38. Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Kim DO, Heo HJ (2010) Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using *in vitro* model system. *Food Chem*, 125, 417-422

(접수 2010년 12월 1일 수정 2011년 4월 28일 채택 2011년 5월 6일)