

녹용의 무기질 조성, 항산화능 및 PC-12 신경 세포 보호능에 대한 급여 사료의 영향

조치흥¹, 이봉한¹, 김혜영¹, 김영채², 김대옥^{1*}

Effect of Feedstuffs on Mineral Composition, Antioxidant Capacity, and Protection of Neuronal PC-12 Cells of Deer Antlers

Chi Heung Cho¹, Bong Han Lee¹, Hae-Yeong Kim¹, Young Chae Kim², and Dae-Ok Kim^{1*}

접수: 2012년 8월 16일 / 게재승인: 2012년 8월 24일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The ash content, mineral composition, total phenolics, antioxidant capacity, and neuroprotective effect of the antlers of deer fed with herb-incorporated feedstuff (HFS) or normal feedstuff (NFS) were comparatively evaluated. The contents of ash and mineral of the antler of deer fed with HFS were significantly lower than its counterpart. The ash and mineral contents of deer antlers decreased generally from the upper section toward the tip section. The ratios of Ca/ash, Ca/P, and Ca/Fe of antler of deer fed with HFS were lower than those of antler of deer fed with NFS. Antlers of deer fed with HFS had higher total phenolics, nitrite scavenging capacity, and antioxidant capacity than those of deer fed with NFS. Antlers of deer fed with HFS or NFS showed *in vitro* neuronal protection of PC-12 cells against oxidative stress in a dose-dependent manner, where antler of deer fed with HFS generally had higher cellular viability than NFS. These results above suggest that the incorporation of the medicinal herbal complex into feedstuff may improve the biological effects of deer antlers.

Keywords: Anti-neurodegenerative effect, Ash, Lactate dehydrogenase release, Oxidative stress, Total phenolics

1. 서론

암, 치매, 당뇨병, 심혈관 질환 등의 퇴행성 질환은 현대의 사회적, 경제적 문제로 대두되어 왔다. 이들 퇴행성 질환은 발병시 치료가 어려운 비가역적인 질환이다. 이들 질환의 발병을 지연 또는 예방을 함으로써 질환 개시 (onset) 시점을 최대한 늦추려는 노력은 노령화 사회에서 사회적, 경제적 비용을 절감시키는 중요한 의미를 갖는다. 이러한 퇴행성 질환의 주된 원인들 중의 하나로 여겨지는 것이 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)이다. Superoxide radical anion ($O_2^{\bullet-}$), 과산화수소 (H_2O_2), hydroxyl radical ($\bullet OH$) 등과 같은 활성산소는 반응성이 매우 크기 때문에 세포막, 단백질, 지방, DNA 등에 산화적 손상을 유발시킨다. 때문에 이러한 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 천연의 기능성 생리활성 물질을 이용하여 암, Alzheimer's disease 등과 같은 퇴행성 질환을 예방하기 위한 연구가 진행되고 있다.

녹용 (*Cervi parvum* Cornu)은 사슴과 (Cervidae)에 속하는 수사슴의 뿔이 딱딱하게 각질화되기 전에 잘라서 약으로 사용하는 것을 이른다. 우리나라를 비롯한 동양사회에서는 인삼과 더불어 중요한 전통약제 (traditional medicine)로 사용되어 왔다. 우리나라에서 사용되고 있는 녹용의 기원 동물로는 사슴아과 (Cervinae) 사슴족 (Cervini)에 속하는 매화록 (*Cervus nippon* Temminck, Japanese deer), 마록 (*C. elaphus*, red deer), 대록 (*C. canadensis*, elk, American Wapiti) 등이 있으며 이외에 노루아과 (Capreolinae)에 속하는 순록 (*Rangifer*

¹경희대학교 식품생명공학과 및 생명자원과학연구원
¹Department of Food Science and Biotechnology and Institute of Life Sciences and Resources, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, South Korea
Tel: +82-31-201-3796, Fax: +82-31-204-8116
e-mail: DOKIM05@khu.ac.kr

²경희대학교 식물·환경신소재공학과
²Department of Ecosystem Engineering, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, South Korea

tarandus, reindeer)의 뿔도 과거에 녹용으로 유통된 적이 있었다 [1].

녹용과 관련하여 다양한 측면에서 연구들이 보고되어 왔다. 녹용의 생리활성 연구로는 항산화 효과 [2], 뇌기능 증진 효과 [3] 등이 있으며, 녹용의 약효 성분 분석 연구 [4-8], gangliosides 분리와 분석 [9-11], 녹용 부위별 미네랄 분석 [9,12] 과 아미노산 분석 [10], 발효 녹용의 생리활성 분석 [11] 등 처럼 녹용의 성분 분석과 관련한 연구들이 다양하게 이루어 졌다. 최근에는 녹용의 생리활성 및 품질을 증진시키기 위한 목적으로 양록 농가에서 천연물 유래의 다양한 약용식물 자원을 사료에 이용하는 농가들이 늘어나고 있으며, 이와 관련해 사료에 구기자 등과 같은 한약재를 첨가하여 사육한 사슴의 녹용 성분 분석 연구 [12], 사료의 단백질 수준에 따른 녹용의 생산성과 품질에 관한 연구 [13] 등이 보고되었다.

녹용의 기능적 품질을 증진시키고자 사슴의 일반사료 (feedstuff)에 익지인 (*Alpiniae xyphyllae* Fructus) 등과 같은 한약재 약용식물 자원을 첨가하고, 사양 사료에 따른 녹용의 품질을 비교한 연구는 부족한 편이다. 본 연구에서는 일반사료와 한약재 첨가 사료로 사육한 사슴의 분골 및 상대 부위의 회분 함량, 무기질 조성, 아질산염 소거능, 총페놀 함량 및 항산화능을 비교 측정하였다. 또한 녹용 추출물의 퇴행성 신경질환 예방에 대한 효과를 측정하기 위해 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 유도한 신경세포 (PC-12)의 보호 효과를 비교 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 실험에 사용한 녹용은 2008년 충청남도 예산군에 소재한 대이농장에서 사양 실험한 elk (*Cervus canadensis*) 품종의 것이었다. 일반사료 (feedstuff)를 이용하여 사육한 사슴과 일반사료에 한방에서 자양강장의 목적으로 사용되는 한약재를 첨가하여 사육한 사슴 녹용의 분골과 상대를 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 한약재는 목단피, 백자인, 쇠양, 택사, 오약, 익모초, 복신, 향부자, 감인, 음양곽, 육종용, 보골지, 과극천, 익지인, 백두구, 여정실, 인진, 초두구, 상삼자, 석창포 등으로 총 20가지 이며, 2007년 부산 소재 약재 상에서 구입하였다. 녹용은 털을 제거한 후 얇게 잘라 동결 건조기를 이용하여 건조한 후 분말화하고 -20°C에서 저장하여 실험에 사용하였다.

2.2. 시약

본 실험에 사용된 시약 중 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, 2,2'-azino-bis (2-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 비타민 C, 2,2'-azobis (2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), catechin, NaOH, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), lactate dehydrogenase (LDH) *in vitro* toxicology assay kit는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

에서 구입하여 사용하였다. RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 medium, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2.3. 회분 및 무기 이온의 분석

녹용의 회분함량은 AOAC (Association of Official Analytical Chemists)에 따라 도가니를 600°C의 회화로에서 1시간 동안 가열한 후 데시케이터 (desiccator)에 옮겨 1시간 동안 방냉 하였다. 이후 도가니의 중량 변화를 확인한 후 각각의 녹용 분말을 3 g씩 도가니에 넣어 600°C 회화로에서 5시간 회화 시켰다. 회화 후 데시케이터에서 방냉시켜 회분의 무게를 측정하였다. 회분 중의 금속 이온을 정량하기 위해 회분 정량으로 얻은 회분 0.1 g에 1 N HCl 4.9 mL을 첨가하여 혼합하였다. 이후 90°C 항온수조에서 10분간 가열한 후 PVDF microfilter를 이용하여 여과하였다. 여액을 적절히 희석하여 유도 결합플라즈마 원자방출분광기 (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer, Leeman Laboratories, Lowell, MA, USA)를 이용하여 회분 내 Ca, P, Na, K, Fe, Mg, Mn, Zn, Cu 등 9개의 금속의 함량을 측정 후, 각각의 녹용 건조 분말 1 g에 대한 mg의 양으로 표기하였다.

2.4. 추출

동결건조 후 분말화된 녹용의 각 부위별 3 g을 200 mL의 증류수와 섞은 후 약탕기 (DWP-5000M, Daewoong Co., Ltd, Naju, Korea)를 이용하여 100°C에서 3시간 동안 추출하였다. 추출물을 Whatman No. 2 filter paper (Whatman International Ltd., Kent, England)를 이용하여 여과한 후 여과박에 200 mL의 증류수를 첨가하여 앞의 추출 과정을 반복하였다. 추출된 추출물은 회전식 농축기 (Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 100 mL로 정용하였다. 이 추출물은 아질산염 소거능, 총페놀 함량, 항산화능 분석에 사용하였다. 신경세포 보호능 평가를 위해서 사용된 시료는 위와 동일한 추출 방법을 통해 얻어진 추출물을 고형분 형태로 완전히 건조시켜 만들었다. 녹용 추출은 독립적으로 3 반복을 실시하였다. 모든 추출물은 질소가스 (N₂)를 충전하여 -20°C에서 보관 하며 실험에 사용하였다.

2.5. 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Kato 등 [14]의 방법을 수정하여 측정하였다. 시료 (100 µL)에 1 mM NaNO₂ (200 µL)와 0.1 N HCl (pH 1.2, 700 µL)을 첨가한 후 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 2% (v/v) 초산 (acetic acid) 5 mL와 Griess 시약 (30% (v/v) 초산을 이용하여 1% (v/v) sulfanilic acid와 1% (v/v) naphthylamine을 만들어 1:1 (v/v)로 혼합하여 제조) 0.4 mL을 첨가하여 섞어 주었다. 이를 15분간 상온에서 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능 (nitrite scavenging capacity)은 Griess 시약 대신 물을 첨가하여 반응시킨 대조군 (control)와 비교 하여 각각의 녹용 부위가 가지는 흡광도의 감소 정도를 아래

의 식을 이용하여 백분율 (%)로 표시하였다.

$$\text{아질산염 소거능 (\%)} = (1 - (A-B)/C) \times 100$$

- A = Griess 시약이 첨가된 시료 첨가구의 흡광도.
- B = Griess 시약이 무첨가된 시료 첨가구의 흡광도.
- C = 시료 무첨가구의 흡광도.

2.6. 총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu’s phenol reagent를 이용한 발색법으로 측정하였다. 시료 200 μL에 증류수 2.6 mL과 200 μL의 Folin-Ciocalteu’s phenol reagent를 첨가하여 교반 후 6분간 상온에서 반응시킨 뒤 7% (v/v) Na₂CO₃ 용액을 2 mL를 첨가하고, 이후 84분 동안 정치시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g dry weight를 이용하였다.

2.7. 항산화능 측정

녹용 추출물의 항산화능은 DPPH와 ABTS 라디칼 (radical)을 이용하여 측정하였다.

2.7.1. DPPH 법

DPPH 법은 DPPH 라디칼 소거능에 기반한 Brand-Williams 등 [15]의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 80% (v/v) 수용성 메탄올을 사용하여 100 μM의 DPPH 라디칼 용액을 제조한 후에, 이 DPPH 라디칼 용액을 80% (v/v) 수용성 메탄올을 이용하여 517 nm에서 0.650 ± 0.020의 흡광도로 희석하였다. 각 시료 50 μL와 DPPH 라디칼 용액 2.95 mL를 첨가하여 23°C에서 30분간 빛이 차단된 장소에서 반응시킨 후 DPPH 라디칼 감소량을 517 nm에서 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능을 통한 녹용 추출물의 항산화능은 mg vitamin C equivalents (VCE)/100 g dry weight로 나타내었다.

2.7.2. ABTS 법

ABTS 법은 청록색의 ABTS 라디칼에 대한 녹용 추출물의 소거능에 기반하여 측정하였다 [16]. PBS (phosphate buffered saline) 완충용액 100 mL에 1.0 mM AAPH와 2.5 mM ABTS가 되도록 섞어서 70°C 항온수조에서 30분간 반응시켜 ABTS 라디칼 용액을 만들고, PBS 완충 용액을 이용하여 734 nm에서 0.650 ± 0.020의 흡광도로 ABTS 라디칼 용액을 희석하였다. ABTS 라디칼 용액 980 μL와 시료 20 μL를 10분간 반응 후 37°C에서 734 nm에서 흡광도의 감소량을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능을 통한 녹용 추출물의 항산화능은 mg VCE/100 g dry weight로 표현하였다.

2.8. 신경세포 보호능

ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)의 신경세포인 PC-12 세포는 10% inactivated fetal bovine serum, 100 unit/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하여 실험에 사용하였다. 녹용 부위별 추출

물의 세포 독성 및 신경세포 보호 효과를 평가하기 위하여 MTT 법과 LDH 방출법을 활용하였다.

2.8.1. MTT 법

PC-12 세포에 대한 시료의 무해한 농도를 평가하는 세포 독성 평가를 위해서 96-well plate에 2.0 × 10⁴ cells/well로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 각각의 녹용 추출물 100 μL를 100, 250, 500, 750, 1000 μg/mL의 농도로 24시간 동안 pre-incubation한 후 MTT 시약을 첨가하고 4시간이 지난 다음 DMSO를 이용하여 formazan을 용해시켜 microplate reader (TECAN, San Jose, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 녹용 추출물의 세포 보호 효과는 세포 독성 실험과 같은 방법으로 세포를 배양하고, 세포 독성이 없는 농도의 시료를 처리한 후 산화적 스트레스를 유도하기 위해 100 μM의 H₂O₂를 1시간 동안 처리하여 인위적으로 세포독성을 유도한 후 MTT 시약을 첨가하고 4시간이 지난 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조구와 비교하여 백분율 (%)로 나타내었다. 세포 생존율 측정은 독립적으로 3 반복을 실시하였다.

2.8.2. LDH 방출법

녹용 추출물의 신경세포 보호 효과를 평가하게 위해 세포막 손상으로 인해 방출된 lactate dehydrogenase (LDH) 양을 정량하여 측정하였다. 배양된 세포들을 96-well plate에 2.0 × 10⁴ cells/well 수준으로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 각각의 녹용 추출물 100 μL를 100, 250, 500, 750, 1000 μg/mL의 여러 농도로 24시간 동안 pre-incubation한 후 100 μM의 H₂O₂를 1시간 동안 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였다. 각각의 상등액 50 μL를 취해 새로운 well plate에 옮겼다. 이 배양액에 LDH assay kit 용액 100 μL를 첨가한 다음 상온에서 30분간 반응시킨 후 15 μL의 1 N HCl을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응이 끝난 배양액은 microplate reader (TECAN)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. LDH 방출량은 대조구에 대한 백분율 (%)로 나타내었다. LDH 방출량에 기반한 세포막 보호효과 측정은 독립적으로 3 반복을 실시하였다.

2.9. 통계 처리

반복 실험의 결과값들은 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, SAS software (Window version 8, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 통계 처리를 하였다. 결과의 유의적인 차이는 Duncan’s multiple range test를 이용하여 실험군간의 차이를 검증하였으며, 실험군간의 p 값이 0.05 이하일 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 회분 및 무기질 함량

일반사료에 다양한 한약재를 첨가한 사료 (herb-incorporated feedstuff)로 사육한 시슴과 일반사료 (normal feedstuff)를

Table 1. Ash and mineral contents of the tip and upper sections of the antlers from deer fed with different feedstuffs

Feedstuffs	Sections of Antler	Ash (mg/g dry weight)	Mineral (mg/g dry weight)									
			Ca	P	Na	K	Mg	Cu	Fe	Zn	Mn	Total
HFS ¹⁾	Tip	179.04 ± 16.17 ²⁾	48.82 ± 0.47 ^d	28.42 ± 0.15 ^d	12.25 ± 0.10 ^a	5.14 ± 0.16 ^b	1.64 ± 0.00 ^c	0.71 ± 0.00 ^{ab}	0.23 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	97.32 ± 0.38 ^d
	Upper	266.63 ± 10.67 ^b	89.70 ± 0.29 ^b	47.71 ± 0.06 ^b	10.64 ± 0.08 ^b	4.03 ± 0.30 ^c	2.41 ± 0.07 ^b	0.86 ± 0.00 ^b	0.35 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a	155.83 ± 0.62 ^b
NFS ³⁾	Tip	255.99 ± 8.68 ^b	84.76 ± 0.00 ^c	46.14 ± 0.43 ^c	9.45 ± 0.05 ^d	5.57 ± 0.09 ^a	2.26 ± 0.00 ^b	0.83 ± 0.00 ^a	0.36 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a	149.51 ± 0.42 ^c
	Upper	286.78 ± 6.81 ^a	99.81 ± 0.21 ^a	53.56 ± 0.37 ^a	9.86 ± 0.13 ^c	4.08 ± 0.87 ^d	2.59 ± 0.03 ^a	0.88 ± 0.00 ^a	0.37 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a	0.08 ± 0.00 ^a	171.29 ± 0.58 ^a

¹⁾HFS represents an herb-incorporated feedstuff. ²⁾All data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Mean with different superscript in the same column is significantly different ($p < 0.05$). ³⁾NFS represents a normal feedstuff.

이용하여 사육한 사슴의 녹용에서 분골 (tip section)과 상대 (upper section)의 회분 (ash) 및 무기질 (Ca, P, Na, K, Mg, Cu, Fe, Zn, Mn) 함량을 비교한 결과를 Table 1에 제시하였다. 회분 함량의 경우, 한약재 첨가군 사슴의 분골과 상대에서는 각각 179.04 mg/g과 266.63 mg/g이었으며, 일반사료만을 이용한 한약재 무첨가군 사슴의 분골과 상대에서는 각각 255.99 mg/g과 286.78 mg/g이었다. 두 사슴군 모두에서 상대가 분골보다 회분 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 한약재 첨가군 사슴의 상대 및 분골의 회분 함량이 한약재 무첨가군의 것들보다 유의적으로 낮았다 (Table 1). 두 사슴군의 분골간 비교에서 한약재 첨가군이 한약재 무첨가군에 비해 약 30.1%의 회분 함량이 감소하였다. 한편 한약재 첨가군의 녹용 상대는 한약재 무첨가군에 비해서 약 7.0%의 회분 함량의 감소를 보였다. 이는 한약재 첨가 사료 급여가 녹용의 분골 부분의 회분 함량에 더 영향을 미친다는 것을 보여준다고 할 수 있다.

분석한 무기질 중에서 Ca, P, Na, K, Mg 등 5개의 무기질 함량은 한약재 무첨가군 및 한약재 첨가군의 분골과 상대 상호간 유의적 차이를 보였으나, Cu, Fe, Zn, Mn 등의 무기질 함량은 두 사슴군에서 유의적 차이를 보이지 않았다 (Table 1). 정량된 무기질 중에서 Ca와 P는 총무기질 함량의 79.4% (한약재 첨가군 분골)에서 89.5% (한약재 무첨가군 상대)를 차지하는 주요한 무기질이였다. 이는 녹용 부위별 연구에서 Ca과 P가 녹용의 주요한 무기질 성분이라는 보고와 일치한다 [12,17]. 한약재 첨가군에서 총무기질 함량이 한약재 무첨가군에 비해서 녹용 부위 중 상대의 경우 약 9.0%, 분골의 경우 약 34.9% 낮았으며, 이들 함량은 유의적 차이를 보였다 (Table 1). 녹용 부위별 총무기질 함량은 두 사슴군 모두에서 상대보다는 분골에서 유의적으로 낮았다 (Table 1).

녹용의 품질을 평가하는 기준에 있어서 대부분의 나라들이 외관에 의한 관능적 관정에 의존하고 있으나, 우리나라의 경우 외관과 회분 함량, 성장 기간을 주 항목으로 하여 평가를 한다 [18]. 일반적으로 녹용은 분골 (tip section)이 상대 (upper section)에 비해 골질화가 덜 진행되어 회분 및 무기질 함량이 낮으며 품질이 더 좋다고 알려져 있다. 하지만 녹용의 품질을 평가할 만한 과학적인 지표는 아직 명확히 확립되어 있지 않아 품질 평가에 있어서 여전히 많은 논란이 있다. 또한 녹용의 품질은 사슴의 영양 상태에 따라 크게 영향을 받는다고 알려져 있는데, 구기자를 일반 사료에 첨가하여 사육한 사슴의 녹용이 일반사료를 이용하여 사육

한 사슴에 비해 uronic acid 및 sialic acid와 같은 생리활성에 영향을 주는 물질의 양이 특이적으로 증가 하였으며, 회분 함량이 무첨가군에 비해 줄어들어 사료의 수준에 따라 녹용의 생화학적 조성이 변하였다 [12]. 이는 품질 좋은 녹용의 생산을 목적으로 사슴을 사육하는데 있어 사슴이 섭취하는 사료에 따라 녹용의 무기질 및 회분 함량에 영향을 받는다는 본 실험의 결과와 일치한다.

3.2. Ca/ash, Ca/P, 및 Ca/Fe 성분비

녹용의 품질을 평가할 수 있는 과학적 지표로 Ca, P, Fe 등과 같은 무기질 함량의 비교뿐만 아니라 Ca/ash, Ca/P, Ca/Fe 등의 성분비가 이용될 수 있다. 전체 회분 중 Ca의 비중이 높을수록 골질화의 정도를 반영할 수 있기 때문에 Ca/ash의 성분비를 이용하여 녹용의 품질을 평가하는 지표로 이용될 수 있으며, 또한 Ca/P의 성분비는 골질화가 진행될수록 비율이 높아지기 때문에 녹용의 골질화 정도를 알 수 있으므로 녹용의 품질을 과학적으로 평가하는 지표로 이용이 가능하며, Fe은 골질화가 진행이 될수록 함량이 감소하는 대표적인 성분이기 때문에 Ca/Fe의 성분비를 구하여 녹용의 품질을 평가할 수 있는 지표로 역시 사용이 가능하다 [9,19].

Table 2. Ratios of Ca/ash, Ca/P, and Ca/Fe in the tip and upper sections of the antlers from deer fed with different feedstuffs

Feedstuffs	Sections of Antler	Ratio		
		Ca/ash	Ca/P	Ca/Fe
HFS ¹⁾	Tip	0.27 ± 0.03 ^{b2)}	1.72 ± 0.02 ^c	214.74 ± 1.90 ^d
	Upper	0.34 ± 0.01 ^a	1.88 ± 0.01 ^a	257.95 ± 1.18 ^b
NFS ³⁾	Tip	0.33 ± 0.01 ^a	1.84 ± 0.02 ^b	234.58 ± 0.00 ^c
	Upper	0.35 ± 0.01 ^a	1.86 ± 0.01 ^{ab}	268.96 ± 0.09 ^a

¹⁾HFS represents an herb-incorporated feedstuff. ²⁾All data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Mean with different superscript in the same column is significantly different ($p < 0.05$). ³⁾NFS represents a normal feedstuff.

Table 2는 Ca/ash, Ca/P, Ca/Fe 등의 성분비에 대한 결과를 보여주고 있다. Ca/ash 성분비가 일반사료를 단독으로 이용하여 사육한 사슴에서 채취한 녹용에 비해 한약재 첨가군 사슴의 녹용 상대 및 분골에서 모두 낮은 값을 보였다. 한약재 첨가군 사슴의 녹용 분골이 다른 녹용 부위들에 비해서 유의적으로 가장 낮은 성분비를 가졌다. Ca/P 성분비의 경우에도 한약재 첨가군 사슴의 녹용 분골이 녹용 상대

Table 3. Total phenolics, nitrate scavenging activity, and antioxidant capacity in the tip and upper sections of the antlers from deer fed with different feedstuffs

Feedstuffs	Sections of Antler	Total phenolics (mg gallic acid equiv./100 g dry weight)	Nitrate scavenging capacity (%)	Antioxidant capacity (mg vitamin C equiv./100 g dry weight)	
				DPPH	ABTS
HFS ¹⁾	Tip	190.7 ± 4.5 ^{b2)}	89.1 ± 1.5 ^a	9.9 ± 3.1 ^b	135.8 ± 6.9 ^b
	Upper	382.7 ± 4.0 ^a	88.7 ± 1.1 ^{ab}	37.0 ± 3.3 ^a	171.6 ± 5.6 ^a
NFS ³⁾	Tip	102.8 ± 2.6 ^d	86.1 ± 2.5 ^b	10.8 ± 2.0 ^b	92.2 ± 3.8 ^c
	Upper	151.2 ± 8.8 ^c	86.1 ± 0.3 ^b	4.8 ± 1.5 ^c	92.7 ± 4.2 ^c

¹⁾HFS represents an herb-incorporated feedstuff. ²⁾All data are expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Mean with different superscript in the same column is significantly different (p < 0.05). ³⁾NFS represents a normal feedstuff.

보다 유의적으로 낮은 성분비를 가졌다. 하지만 한약재 무첨가군 사슴의 경우 상대와 분골 간에 Ca/P 성분비가 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 분골에 비해 상대에서 낮은 Ca/P 성분비를 보였다. 녹용 상대에서 하대로 내려갈수록 Ca/Fe 비율이 증가한 보고처럼 [9], 본 연구에서도 한약재 첨가군 및 무첨가군 사슴 모두에서 분골에서 상대로 내려갈수록 Ca/Fe 성분비가 유의적으로 증가하였다.

사료의 처리에 따라 한약재 첨가군 사슴에서 채취한 녹용에서 골형성에 관여하는 무기질인 Ca와 P의 함량이 한약재 무첨가군의 것에 비해서 유의적으로 낮게 나타났다 (Table 1). 특히 한약재 무첨가군 사슴의 녹용에 비해 한약재 첨가군의 경우 녹용의 주요 품질평가 지표인 회분 함량의 감소 및 골형성에 관여하는 주요 무기질인 Ca, P의 축적이 적게 이루어져 녹용의 골질화가 덜 일어남을 알 수 있었다 (Table 2). 이상의 결과는 사료의 종류에 의해 녹용의 회분, 무기질 함량, 그리고 이들의 조성이 영향을 받는다는 것을 보여준다.

3.3. 총페놀 함량

한약재 첨가 유무에 따른 사료의 사양 실험을 통해 얻어진 녹용의 상대와 분골 추출물의 총페놀 함량에 대한 결과는 Table 3에 나타내었다. 한약재 첨가군 사슴의 녹용이 한약재 무첨가군 사슴의 녹용에 비해서 상대와 분골에서 모두 유의적으로 높은 총페놀 함량을 가졌다. 한약재 첨가군 사슴의 녹용 상대는 한약재 무첨가군 사슴의 상대보다 약 2.53배 높은 총페놀 함량을 보였다. 한약재 첨가군 사슴의 녹용이 한약재 무첨가군 사슴 녹용에 비해서 총페놀 함량이 유의적 높게 나타난 것은 한약재에 있는 페놀성 화합물 (phenolic phytochemicals) 등과 같은 항산화제 역할을 하는 물질들이 사슴의 생체내에서 소화·흡수·대사되어 사슴의 뿔로 이동하였기 때문일 것으로 생각된다.

3.4. 아질산염 소거능

녹용 부위별 물 추출물을 이용하여 아질산염 소거능을 측정하였고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 한약재 첨가군 사슴에서 채취한 녹용의 분골과 상대에서 아질산염 소거능은 각각 89.1%, 88.7%이었으며, 한편 한약재 무첨가군 사슴에서 채취한 녹용의 분골과 상대에서 모두 86.1%의 아질산염 소거능을 나타내었다 (Table 3). 한약재 첨가군 사슴에서 채취한 녹용이 그렇지 않은 한약재 무첨가군 사슴의 녹용에

비해서 아질산염 소거능이 높았다. 이는 아마도 사료에 한약재를 첨가하여 사육한 사슴의 녹용에는 페놀성 화합물 같은 항산화능을 보유한 생리활성 물질이 한약재가 첨가된 사료 급여를 통해서 소화·흡수된 후에 녹용에 축적이 이루어져 아질산염을 더 높은 수준에서 소거하는 것으로 여겨진다.

질산염은 식물체내, 소화기관 및 식품의 저장 과정에서 질산환원효소, 환원세균 등의 작용에 의해 아질산염으로 환원된다. 식품에 있는 질산염 또는 아질산염은 위장 내의 낮은 산성 조건에서 니트로소화 반응 (nitrosation)을 거쳐 다양한 부위에서 발암물질 (carcinogen)로 작용하는 nitrosoamines를 생성할 수 있다 [20]. 니트로소화 반응을 억제하기 위해서는 nitrosoamines의 생성을 억제하거나 아질산염을 소거하는 방법이 있으며, 일반적으로 아질산염의 소거에는 비타민 C, 비타민 E, 페놀성 화합물 등이 이용되고 있다 [20]. 위 결과로부터 아질산염 소거능을 갖는 녹용 추출물이 발암물질로 작용하는 nitrosoamines의 형성을 억제할 수 있는 소재로 사용이 가능하다는 것을 보여주고 있다.

3.5. 항산화능

녹용의 항산화능을 DPPH와 ABTS 라디칼을 이용하여 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 녹용의 항산화능을 DPPH 라디칼을 이용하여 측정했을 때, 한약재 첨가군 사슴의 녹용 분골과 상대에서는 각각 9.9 mg VCE/100 g과 37.0 mg VCE/100 g이었으며, ABTS 라디칼을 이용시 각각 135.8 mg VCE/100 g과 171.6 mg VCE/100 g이었다. 한약재 무첨가군 사슴의 녹용 분골과 상대에서는 DPPH 라디칼을 이용했을 경우 각각 10.8 mg VCE/100 g과 4.8 mg VCE/100 g의 항산화능을 가졌고, ABTS 라디칼을 사용했을 경우에는 92.2 mg VCE/100 g과 92.7 mg VCE/100 g의 항산화능을 보였다. 두 가지 라디칼을 이용하여 측정한 녹용의 항산화능은 한약재 첨가군 사슴에서 한약재 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 수치를 보였다. 이는 한약재에 존재하는 페놀성 화합물과 같은 항산화능을 보유하는 생리활성 물질들이 소화·흡수 되었기 때문인 것으로 여겨진다. 총페놀 함량을 측정된 결과에서처럼 녹용의 항산화능은 한약재 무첨가군의 녹용보다는 한약재 첨가군 사슴의 녹용에서 높았으며, 동일 사슴군의 녹용 상대와 분골 부위 중에서 상대가 더 높았다.

사료에 한약재를 첨가하여 사슴을 사육할 경우 일반사료를 단독으로 이용하여 사육한 사슴의 녹용에 비해 녹용에

존재하는 총페놀 함량이 증가하였고, 총페놀 함량의 증가에 기인하여 항산화능이 증가하였다 (Table 3). 이에 따라 녹용의 총페놀 함량과 항산화능은 양의 기울기를 갖는 1차 직선의 상관관계로 나타났다 (Fig. 1). 녹용 각 부위별 총페놀 함량과 ABTS 법으로 측정된 항산화능의 상관계수 (correlation coefficient, r^2)는 0.883, 한편 DPPH 법으로 측정된 경우의 상관계수는 0.864이었다. 본 연구와 마찬가지로 총페놀 함량과 항산화능 사이에는 양의 기울기를 갖는 일차적 상관관계가 있음을 보고한 기존의 여러 연구들이 있었다 [21,22].

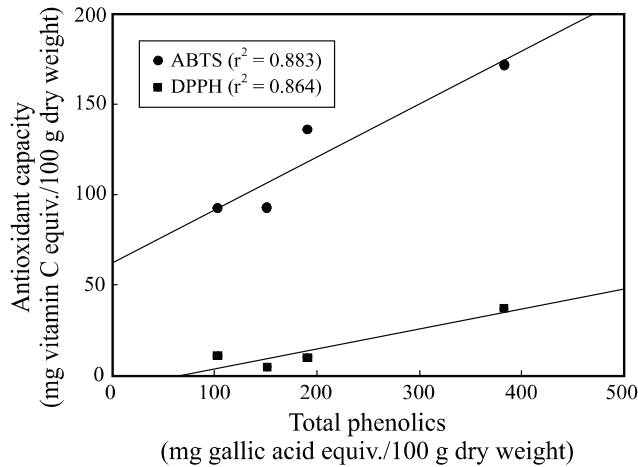


Fig. 1. Correlation between total phenolics and antioxidant capacity measured by using ABTS and DPPH radicals of water extract of deer antlers.

3.6. 신경세포 보호 효과

산화적 스트레스로부터 PC-12 신경세포에 대한 녹용의 보호 효과는 MTT 법을 이용하여 나타내었다 (Fig. 2). 신경세포 보호효능 평가에 앞서 녹용 추출물의 세포독성을 측정하였으며, 모든 녹용 추출물이 1000 µg/mL까지 세포독성을 보이지 않았다 (data not shown). 이후 녹용 추출물이 세포독성을 보이지 않는 최고 농도인 1000 µg/mL 범위 내에서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 하에서 실험을 진행하였다. 녹용 추출물을 처리하지 않고 H₂O₂만을 처리한 스트레스 대조구 (55.9%)에 비해서 한약재 첨가군 사슴의 녹용 분골과 상대로부터 나온 추출물 750 µg/mL 농도에서 신경세포 생존율은 각각 22.2%와 21.0%씩 유의적으로 상승했다. 한약재 무첨가군 사슴의 분골과 상대에서는 1000 µg/mL 농도에서 H₂O₂만으로 노출된 세포에 비해 각각 최대 12.5%와 10.3%까지 세포 생존율이 유의적으로 증가하였다. 각각의 녹용 추출물을 PC-12 세포에 처리하였을 때 세포의 생존율이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였고, 이는 녹용 추출물이 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 PC-12 신경세포 손상을 억제한다는 것을 의미한다. 한약재 첨가군 사슴의 녹용 추출물이 한약재 무첨가군 사슴의 녹용 추출물보다 더 높은 신경세포 생존율을 보였다. 본 연구처럼 라디칼 소거과 같은 항산화능을 보유하는 물질에 의해서 산화적 손상으로 부터 신경세포를 보호하는 결과도 이미 보고된 바 있다 [23,24].

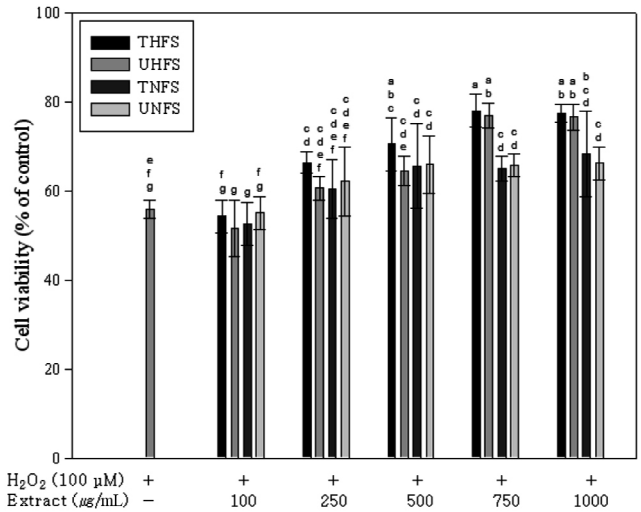


Fig. 2. Protective effects of water extract of deer antlers against H₂O₂-induced oxidative stress in neuronal PC-12 cells. THFS and UHFS represent tip and upper sections of the antlers of deer fed with herb-incorporated feedstuff, respectively. TNFS and UNFS represent tip and upper sections of the antlers of deer fed with normal feedstuff, respectively. Different letters on bars indicate significant difference of the means among deer antlers by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

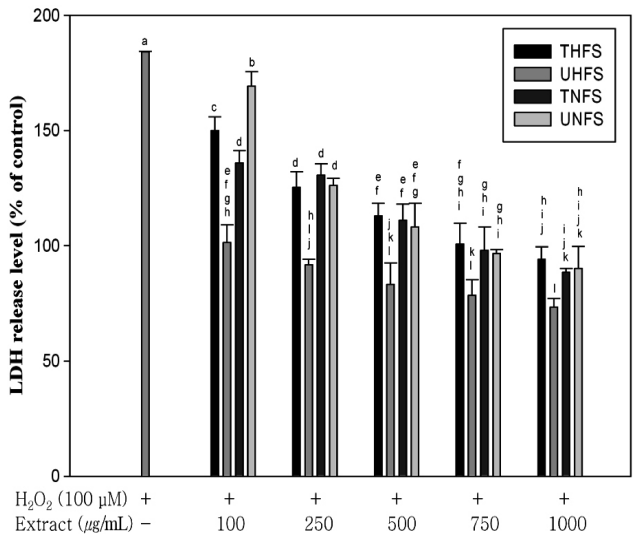


Fig. 3. Inhibition effects of lactate dehydrogenase (LDH) release of water extract of deer antlers on H₂O₂-induced membrane damage in neuronal PC-12 cells. THFS and UHFS represent tip and upper sections of the antlers of deer fed with herb-incorporated feedstuff, respectively. TNFS and UNFS represent tip and upper sections of the antlers of deer fed with normal feedstuff, respectively. Different letters on bars indicate significant difference of the means among deer antlers by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

녹용 추출물의 신경세포 손상 보호 정도를 측정하기 위한 또 다른 방법으로 LDH (lactate dehydrogenase) 방출법을 이용하였다. LDH는 거의 모든 조직에서 발견되는 효소다. 산화적 스트레스로 인한 세포조직의 손상에 의해 세포 밖으로 LDH가 방출된다. 특히, 신경세포의 경우 상대적으로 많

은 불포화 지방산을 함유하고 있어 산화적 스트레스에 취약하다. 따라서 H₂O₂에 의해 유도된 신경세포막 손상에 대한 녹용 추출물의 신경세포 보호능을 평가하기 위해 신경세포에서 방출된 LDH 양을 측정하였고 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. H₂O₂를 처리하지 않은 무첨가군 (100%)에 비해 100 µM의 H₂O₂에 1시간 동안 노출된 PC-12 신경세포의 경우 LDH 방출량은 184.3%로 증가하며 유의적인 차이를 보였다. 이는 산화적 스트레스에 의해서 신경세포의 세포막 손상이 발생하여 세포 내의 LDH가 방출되었다는 것을 의미한다. 한약재를 첨가한 사료로 사육한 사슴의 녹용 상대의 추출물 농도 1000 µg/mL에서 LDH 방출량은 73.4%로 모든 처리구에서 유의적으로 가장 낮은 값을 보였다. 4종류의 녹용 추출물을 여러 농도로 처리하였을 때 LDH 방출량이 농도 의존적으로 감소하였고, 모든 처리 농도에서 산화적 스트레스만을 처리한 군과 비교하여 유의적으로 낮은 LDH 방출량을 보였다 (Fig. 3). 이는 녹용 추출물이 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호했다는 것을 의미한다.

4. 결론

녹용의 품질 향상을 목적으로 일반사료에 다양한 한약재를 첨가하여 사육한 사슴의 녹용과 일반사료만으로 사육한 사슴의 녹용의 회분 함량, 무기질 함량, 총폐놀 함량, 아질산염 소거능, 항산화능, 신경세포 보호능을 비교 분석하였다. 녹용의 동일 부위별 비교시 한약재 첨가군 사슴이 한약재 무첨가군 사슴에 비해서 회분 및 무기질 함량이 유의적으로 낮았다. 녹용의 품질평가 지표로 이용되는 Ca/ash, Ca/P, Ca/Fe의 비교시에도 한약재 첨가군 사슴의 녹용이 한약재 무첨가군 것보다 전반적으로 낮은 값을 보였다. 한약재 첨가군 사슴의 녹용이 항산화능, 아질산염 소거능, 총폐놀 함량 등에서도 한약재 무첨가군 사슴의 녹용보다 더 높았다. 녹용 추출물은 산화적 스트레스로 야기된 신경세포의 손상을 농도 의존적으로 낮추었다. 위 결과들은 한약재를 첨가한 사료로 사양된 사슴의 녹용이 그렇지 않은 사슴의 녹용보다 골질화가 덜 진행되고, 항산화능이 높아지고, 신경세포 보호능이 향상되었다는 것을 보여주고 있다.

References

1. Sunwoo, H. H., T. Nakano, R. J. Hudson, and J. S. Sim (1995) Chemical composition of antlers from Wapiti (*Cervus elaphus*). *J. Agric. Food Chem.* 43: 2846-2849.
2. Wang, B.-X., X.-H. Zhao, X.-W. Yang, S. Kaneko, M. Hattori, T. Namba, and Y. Nomura (1988) Inhibition of lipid peroxidation by deer antler (Rokujo) extract *in vivo* and *in vitro*. *J. Med. Pharma. Soc. WAKAN-YAKU* 5: 123-128.
3. Qi, S.-B., X.-H. Zhao, X.-W. Yang, M. Hattori, T. Namba, and Y. Nomura (1988) Effects of ethanol extract of "Rokujo", pilose antler, on uptake and release of noradrenaline in cerebral cortical slices of rats. *J. Trad. Med.* 5: 93-97.

4. Kim, Y. E., S. K. Lee, U. C. Yoon, and J. S. Kim (1975) Biochemical studies on antler *Cornus Cervi Parvum* (I). A comparative study on chemical components of antler, old antler, shark backbone cartilage and whale nasal cartilage. *Korean Biochem. J.* 8: 89-107.
5. Kim, Y. E., S. K. Lee, M. H. Lee, and S. U. Shin (1976) Biochemical studies on antler (*Cervus nippon taiouanus*) (III). A study of free and ester fatty acids of antler velvet layer and pantocrin. *Korean Biochem. J.* 9: 215-236.
6. Kim, Y. E., S. K. Lee, and H. J. Yoo (1976) Biochemical studies on antler *Cornus Cervi Parvum* (II). A study on acid mucopolysaccharides of antler. *Korean Biochem. J.* 9: 153-164.
7. Kim, Y. E., S. K. Lee, and M. H. Lee (1977) Biochemical studies on antler (*Cervus nippon taiouanus*) (IV). Detection of prostaglandins of antler velvet layer. *Korean Biochem. J.* 10: 1-12.
8. Kim, Y. E., D. K. Lim, and S. U. Shin (1977) Biochemical studies on antler (*Cervus nippon taiouanus*) (V). A study on glycolipids and phospholipids of antler velvet layer and pantocrin. *Korean Biochem. J.* 10: 153-164.
9. Hong, N. D., D. H. Won, N. J. Kim, S. Y. Chang, W.-G. Youn, and H.-S. Kim (1991) Studies on the analysis of constituents of deer horn (I). Assay of trace elements and TLC pattern analysis of gangliosides. *Korean J. Pharmacog.* 22: 171-182.
10. Hong, N.-D., D.-H. Won, N.-J. Kim, S.-Y. Chang, W.-G. Youn, and H.-S. Kim (1993) Studies on the analysis of constituents of deer horn (II) - Analysis of gangliosides and free amino acids. *Korean J. Pharmacog.* 24: 38-46.
11. Kim, D.-H., S.-B. Han, J.-S. Park, and M. J. Han (1994) Fermentation of antler and its biological activity. *Korean J. Pharmacog.* 25: 233-237.
12. Ha, Y. W., B. T. Jeon, S. H. Moon, and Y. S. Kim (2003) Comparison of biochemical components among different fodders-treated antlers. *Korean J. Pharmacog.* 34: 40-44.
13. Jeon, B. T., S. H. Moon, and R. J. Hudson (2003) Effects of dietary protein level on velvet antler production in red deer (*Cervus elaphus*). *J. Anim. Sci. Technol.* 45: 577-584.
14. Kato, H., I. E. Lee, N. van Chuyen, S. B. Kim, and F. Hayase (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* 51: 1333-1338.
15. Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30.
16. Kim, D.-O., K. W. Lee, H. J. Lee, and C. Y. Lee (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3713-3717.
17. Lee, B.-Y., O.-H. Lee, and H.-S. Choi (2003) Analysis of food components of Korean deer antler parts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 52-56.
18. Park, P.-J., Y.-J. Jeon, S.-H. Moon, and B.-T. Jeon (2005) Chemical composition and biological activity of velvet antler. *Food Ind. Nutr.* 10: 50-59.
19. Kim, H.-Y. and M.-R. Rhyu (2000) Sectional composition of minerals in domestic deer antler. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 31-36.
20. Bartsch, H., H. Ohshima, and B. Pignatelli (1988) Inhibitors of endogenous nitrosation - Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat. Res.* 202: 307-324.
21. Cho, E. J., H.-M. Ju, C. H. Jeong, S. H. Eom, H. J. Heo, and D.-O. Kim (2011) Effect of phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on antioxidant capacity and tyrosinase inhibition.

- Korean J. Hort. Sci. Technol.* 29: 358-365
22. Lee, B. H., S. Y. Kim, C. H. Cho, D. K. Chung, O. K. Chun, and D.-O. Kim (2011) Estimation of daily per capita intake of total phenolics, total flavonoids, and antioxidant capacities from fruit and vegetable juices in the Korean diet based on the Korea national health and nutrition examination survey 2008. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 475-482.
23. Kim, D.-O., H. J. Heo, Y. J. Kim, H. S. Yang, and C. Y. Lee (2005) Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9921-9927.
24. Kim, J. H., C.-J. Jeong, G. N. Choi, J. H. Kwak, S.-G. Choi, and H. J. Heo (2009) Antioxidant and neuronal cell protective effects of methanol extract from *Schizandra chinensis* using an *in vitro* system. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 712-716.