

< Original Article >

대나무 분말의 항산화력과 돼지의 면역 활성화에 미치는 영향

송윤오¹ · 추교문² · 장선희¹ · 구애진¹ · 고응규³ · 하지희² · 이재형² · 강석남² · 송영민^{2*} · 조재현^{1*}
경상대학교 수의학과 · 생명과학연구원¹, 경남과학기술대학교 동물소재공학과², 농촌진흥청 축산과학원³

Antioxidant activity of Bamboo powder and its immunoreactivity in the pig

Yuno Song¹, Gyo-Moon Chu², Sun-Hee Jang¹, Ae-Jin Goo¹, Yeoung-Gyu Ko³, Ji Hee Ha²,
Jae-Young Lee², Suk-Nam Kang², Young-Min Song^{2*}, Jae-Hyeon Cho^{1*}

¹Institute of Life Science, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Department of Animal Science & Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

³Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

(Received 19 March 2014; revised 5 June 2014; accepted 10 June 2014)

Abstract

The present study was designed to explore the antioxidant effect of Bamboo powder and its immunoreactivity in pigs. We investigated the functional properties of Bamboo extracts by means of measuring the contents of total polyphenols and flavonoid as well as determining ABST, DPPH radical scavenging activity, and hydroxyl radical scavenging activity and anticancer activity. The total phenolic compound and flavonoids contents of Bamboo extracts were 171.25 mg/g and 127.5 mg/g, respectively. The DPPH radical, hydroxyl radical, ABST radical scavenging activity of Bamboo extracts were 17.3%, 12.5% and 21.5%, respectively. Evidenced by MTT and cell cycle assay, Bamboo dose-dependently inhibited the cell proliferation and induced G0/G1-phase arrest in CHO cells at concentrations of 100, 250, and 500 µg/ml Bamboo extracts. More than 80% of apoptotic cells were observed by staining with annexin V in 500 µg/ml Bamboo-treated CHO cells, indicating that Bamboo had potent anticancer activities. Next, to investigate the effect of Bamboo on cytokine, immunoglobulin concentration, and blood compositions, flatting pigs were fed with Bamboo powder for 38 days. Flatting pigs were divided into 4 groups; basal diet (control), basal diet supplemented with 1% Bamboo powder (T1), 2% Bamboo powder (T2), and 3% Bamboo powder (T3). The level of hemoglobin increased in the all Bamboo-fed groups compared with the normal control group. In particular, platelet levels in the all Bamboo-treated groups increased by approximately 90% compared with the levels from pig on a normal control. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA) in the pigs fed Bamboo powder were modestly increased, and the interferon-γ level also was strongly increased in 2% or 3% Bamboo-fed groups compared with the levels in control groups. Together, these results demonstrated that Bamboo extracts had an effective capacity of scavenging for ABTS, DPPH, and hydroxyl radicals and showed correlation with potent phenol and flavonoid contents, thus suggesting its antioxidant potential. Moreover, administration of Bamboo in 2~3% improved blood parameters and platelets, and especially immunity-related ones such as IgG, IgA, and interferon-γ, leading to be potential feed additives in flatting pigs.

Key words : Bamboo, Antioxidant, total polyphenols, flavonoids, blood composition, immunoglobulins

*Corresponding author: Jae-Hyeon Cho, Tel. +82-55-772-2358,
Fax. +82-55-772-2349, E-mail. jaehcho@gnu.ac.kr
Young-Min Song, Tel. +82-55-751-3282, Fax. +82-55-751-3689,
E-mail. pigsong@gntech.ac.kr

서 론

우리나라 양돈 농장은 과밀집사육과 열악한 양돈 산업 환경으로 환절기 질병 발생율이 높고 이로 인한 무분별한 약제 남용은 돼지의 내병성을 크게 떨어뜨릴 수 있다. 항생제 남용으로 축산물 항생제 잔류로 국민 건강에 대한 위협을 줄 수 있으며, 유럽을 비롯한 축산 선진국에서는 항생제의 사용을 전면 금지하고 있는 실정이므로 국내에 원료공급이 풍부한 면역기능성 물질을 이용한 돼지 사료제 개발이 계속 늘어나고 있는 추세이다.

특히 양돈 산업은 2006년 말부터 이어진 국제 사료 가격 상승에 의한 값비싼 사료비와 축산물의 수입개방에 의한 경쟁력 하락으로 어려움에 직면해 있으며, 가축 사료 내 질병 예방 및 생산성 향상을 위한 사료 첨가제에 대한 규제가 강화되면서 이를 부분적으로 또는 안전하게 대체할 수 있는 사료 첨가제에 대한 연구가 활발하게 이루어야 할 필요가 있다. 천연약용 식물로부터 분리된 다양한 생리활성 물질이 질병의 예방, 치료 및 건강에 효과가 있다는 사실이 많은 연구들에 의하여 지속적으로 보고되어 왔으며(Newman와 Devegowda, 1998; Mark, 2000), 천연약용물질은 자연 원료로서 부작용이 적고 무잔류성, 그리고 미생물의 저항성을 유도하지 않아 가축의 사료 혹은 식품에서 항생제나 무기화합물을 대체할 수 있는 이상적인 첨가제로 각광을 받기 시작하였다. 최근에는 한약제와 같은 천연식품 중에서도 상당한 항산화력, 면역활성, 항균활성 물질이 존재하여 이들 성분의 약리작용 및 활성물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 생약성분을 함유하는 여러 가지 약용식물 혹은 생약 성분 추출물을 이용한 연구는 계속 늘어나고 있는 추세이다(Jang 등, 2010; Dausch 등, 1990).

모든 생물체는 생체 내에서 에너지 생산을 위한 산소 이용 과정에서 유해산소로 알려져 있는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생성한다(Khan 등, 2012). 그러나 이들 ROS가 정상적으로 소거되지 않을 때 자유라디칼로 인한 산화적 스트레스가 세포나 세포소기관의 막지질 과산화에 의한 막 또는 소기관의 손상, 효소 단백질의 아미노산 잔기의 산화를 통한 비가역적 불활성화, 핵산 염기의 변형 및 산화적 분해 절단을 통한 DNA 손상을 유도하여 각종 질병을 유발한다(Bosoi 등, 2013). 약용식물 추출물들은 항산화력이 강하여 체내 활성산소 및 프리 라디칼을 제거하고, 염증을 저하, 면역력을 증강시켜, 각종 질

병의 발생을 억제시킨다. 이미 알려져 있는 항산화성 물질에는 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드, 아스코르브산, 토코페롤, 인지질 등의 천연 항산화제가 있으나(Huang 등, 1992) 보다 안전하고 생체 방어력을 증가시킬 수 있는 강한 항산화제에 대한 요구는 날로 증가되고 있는 경향이다(Lee 등, 2008). 천연 항산화제는 대부분 식물기원의 항산화성 화합물로서 나무, 수피, 줄기, 잎, 과일, 뿌리, 꽃, 열매, 씨앗 등의 모든 부분에 존재하고 있으며, 이들은 주로 페놀 또는 플라보노이드화합물로서 프리 라디칼의 생성을 지연 시키거나 활성을 저해하여 항산화 물질로서의 역할을 한다(Lee 등, 2005; Lee 등, 2001).

대나무는 벼과(gramineae)에 속하는 식물로 한국, 중국, 일본 등 동남아시아에 주로 분포하며, 한국에서는 재배 면적으로 볼 때 전남 4,608 ha (57%), 경남 2,425 ha (30%)로써 전체 대나무의 87%를 차지하고 있다. 대나무(bamboo)는 뿌리에서부터 잎까지 약용으로 활용도가 높아 예로부터 민간요법으로 널리 사용되었고, 동의보감, 본초강목 및 산농본초경에서 증풍과 고혈압 치료에 탁월한 효과가 있다고 기록되어져 있다(Goo, 1997; Kweon 등, 2001). 대나무의 주요 특성의 하나는 육상 식물과 달리 황산기를 함유한 다당을 다량 함유하고 있으며 이 산성 다당은 항종양, 항바이러스, 면역증강 및 혈액 항 응고 작용 등 다양한 기능을 하는 것으로 보고되고 있다(Steinmetz와 Potter, 1991). 특히 대나무 잎은 죽엽이라 하여 열내림, 피멧이 약, 증풍, 고혈압 등의 민간요법과 살균, 항진균 작용과 항암효과도 있는 것으로 알려져 있으며(Zhang, 2002; Kim 등, 2007), 또한 대나무 잎 추출물은 혈당 강하제로 사용되는 약제인 acarbose보다도 우수하게 탄수화물 분해 효소 활성을 억제하였으며, streptozotocin으로 유발된 당뇨 생쥐에서는 직접적인 혈당 강하 효과를 보였다(Hwang와 Han, 2007).

이러한 선행 연구들을 통하여 대나무 추출물은 동물 사료 자원으로서 충분한 가능성이 있는 것으로 사료되지만, 현재 국내에서 생산되는 대나무 소재를 가축에 이용한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 국내에 아주 왕성하게 번식하고 있는 대나무를 자원화 시켜 환경문제를 해결하고 더 나아가 대나무의 생리활성 효과를 가축에게 적용시키는 연구가 필요하다. 본 연구는 대나무가 새로운 돼지사료 첨가제 소재로서 항산화, 면역조절 효과가 있는지 확인하고자 실시하였으며, 이를 위해 대나무 추출물의 총페놀 함량, 플라보노이드 함량을 알아보았고, DPPH 라디칼 소거활성

및 hydroxyl radical 소거활성 등을 측정하여 항산화 효과를 검증하였다. 또한 암세포주에서의 암세포 성장 억제 및 apoptosis 유발능을 탐색하였으며, 더욱 이들 대나무 분말을 돼지 비육돈에 급여하여 혈액 생화학 조성 및 혈구계수에 미치는 영향을 알아보았으며, 면역글로불린 함량을 비롯한 면역관련 지표들을 분석하여 면역원성 증강에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

대나무 분말 생산 및 에탄올 추출물의 제조

본 실험에 사용된 대나무는 보림산업 주식회사(경상남도 진주시 대곡면 소재)에서 2~4년생 대나무를 경상남도 남해군 일대에서 2012년 7~9월에 채취하였다. 대나무분말의 생산과정은 세단계로 나누어 생산하였다. 첫 번째 단계는 맹족죽을 대나무를 채취하여 대나무 가지 및 대나무 잎을 제거하였다. 두 번째 단계는 제거된 대나무를 대나무 분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 세 번째 단계는 대나무분말을 건조하여 실험용으로 사용하였다. 건조된 대나무분말은 진공이송 장치로 이용하여 저장탱크에서 저장하였고, 저장되어진 대나무분말은 원하는 제품별로 단위 포장하였다. 항산화력 측정을 위한 대나무 분말은 건조 대나무 분말 시료 20 g당 15 배량(w/v)의 80% ethanol에 72 시간 동안 추출한 다음, 추출액은 여과지(Whatman No. 1, Maidstone, England)로 여과하였다. 이후 여과액을 회전 진공증발기(EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 냉동 보관하였다가 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 DPPH 라디칼, ABST 라디칼, HRSA 소거활성능 등 항산화능 검사를 위한 시료로 사용하였고, 또한 MTT assay, 세포주기 실험 시료로 사용하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Meda의 방법(Meda 등, 2005)을 약간 변형하여 측정하였다. 시료 추출물 1 mL에 Aluminum nitrate (10%, W/V)의 0.1 mL, 1M Potassium acetate의 0.1 mL, ethanol 4.3 mL을 차례로 첨가하여 혼합하고 실온에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 대나무 추출액의 플라보노이드 함량은 표준물질로 Quercetin (Siama-

drich Co.)을 이용한 검량선에 의하여 측정하였다.

총폴리페놀 함량

총폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법(Singleton와 Rossi, 1965)을 약간 변형하여 측정하였다. 시험관에 각 효소별 가수분해물 1 mL, 95% ethanol 1 mL, 증류수 5 mL, 50% Folin-Ciocalteu-reagent 0.5 mL를 가하여 실온에 5분간 방치하여 반응 시킨 후, 5% Na₂CO₃ 1mL를 가하고 어두운 곳(실온)에서 1시간 반응시킨 다음 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총폴리페놀 함량은 (+)catechin 표준액에 의하여 작성한 검량선에 따라 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

대나무 추출물의 DPPH 유리기 소거활성은 Brand-Williams 등(1995)의 방법에서 약간 수정된 방법으로 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여 활성으로 나타내었다. 즉 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하여 시료구에는 시료 2 mL와 DPPH 용액 2 mL, 공구시험구는 시료 2 mL와 MeOH 2 mL, 대조구는 DMSO 2 mL와 DPPH 용액 2 mL를 넣어 완전 혼합하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer (Opron 3000 Hanson Tech. Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거활성

2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)와 potassium persulfate을 혼합하여 암소에 두면 ABTS 양이온이 생성되는데 추출물의 항산화 물질과 반응하여 양이온이 소거됨으로써 특유의 청록색이 탈색되며 이의 흡광도를 측정하여 항산화 능력을 측정하였다(Re 등, 1999). 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM potassium persulfate을 혼합하여 암소에서 약 15시간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 희석하였다. 희석한 용액 300 µL에 1, 0.1 mg/mL로 조제한 시료 20 µL를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에 30분간 방치한 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 라디칼의 제거활성으로 나타냈으며 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

Hydroxyl 라디칼(HO) 소거활성

Hydroxyl 라디칼의 소거활성은 Lopes 등(1999)의 방법에 따라 ethylenediaminetetra acetic acid disodium salt (EDTA)가 포함된 Fenton 반응계($\text{Fe}_2^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{H} + \text{OH}\cdot$)에서 분석하였다. 즉, 시험관에 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM EDTA 및 10 mM 2-deoxyribose를 각각 0.2 mL와 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4) 1.0 mL를 넣어 총 1.8 mL로 조제하였다. 여기에 10 mM H_2O_2 2.0 mL를 가하고 37°C의 incubator에서 4시간 반응시킨 다음 2.8% trichloroacetic acid (TCA) 용액 1.0 mL와 1.0% TBA (thiobarbituric acid) 용액 1 mL를 가하여 100°C에서 10분간 반응시킨 후 급속히 냉각하고 395 g에서 5분간 원심분리시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MTT assay

암세포에 대한 시료 추출물의 증식 억제 활성은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 방법에 따라 수행하였으며, 암세포주는 쥐의 난소 유래 CHO 세포를 한국 세포주은행(KCLB, Korea Cell Line bank, Seoul, Korea)에서 분양받았다. 10% FBS, penicillin (100 unit/mL), Streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 첨가한 DMEM 배지로 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. MTT assay는 세포의 생육을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성하는 원리를 이용한다. 암세포를 48 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 300 μL 씩 분주하여 24시간 후 시료를 일정한 농도로 제조하여 10 μL 첨가하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 PBS에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 30 μL 를 첨가하고, 동일한 배양조건에서 4시간을 배양하였다. 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 300 μL 를 가하여 ELISA reader (Molecular Devices, SpectraMAX 340 pc)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비(%)로 계산하였다.

세포주기 분석(PI 염색)

대나무 추출물이 CHO 세포주기에 미치는 영향에 대한 분석을 위하여 대나무 추출물을 다양한 농도로

CHO 세포에 처리하여 자동세포 분석기(Muse™ Cell Analyzer, CA, USA)로 세포주기를 분석하였다. 세포는 6-well plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 분주하였고 대나무 추출물의 농도는 0~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리 후 24시간 동안 배양하여 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하고 70% ethanol로 -20°C에서 4시간 고정한 후, Muse™ Cell Cycle kit 사용하여 30 분간 염색하였다. 염색된 DNA는 자동세포 분석기(Muse™ Cell Analyzer, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

세포사멸 측정(Annexin V 염색)

세포에서 세포사멸에 대한 신호전달이 일어나면 세포막 내부에 있는 인지질인 phosphatidylserin (PS)이 세포막 외부로 노출되는데, 이를 Annexin V 단백질 이용하여 측정 할 수 있다. 간략히, CHO 세포를 6-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, 대나무 추출물을 다양한 농도로 CHO 세포에 처리하여 각각 24시간 배양 후, 세포를 모아 PBS로 세척하였다. 그 후, Muse™ Annexin V & Dead Cell kit를 사용하여 세포를 염색하여 자동세포 분석기(Muse™ Cell Analyzer, CA, USA)로 측정하였다.

대나무분말의 돼지 급여시험

공시가축은 일령(140±1일)이 비슷하고 생체중이 77.10±1.86 kg인 삼원교잡종 비육돈 120두를 암·수 혼사하여 배치하여 각 돈방 당 10두씩 배치하여 4개의 처리구로 3반복으로 급여시험을 실시하였다. 급여시험 개시 시부터 출하 시까지는 비육돈 사료를 무제한 급여하였다. 처리구는 배합사료 급여구(대조구, control) 대나무분말을 1.0% (처리1구, T1), 2.0% (처리2구, T2) 및 3.0% (처리3구, T3)을 첨가하여 급여하였다. 시험구의 돈방 면적, 사료 및 급수 시설은 동일하게 부여하였고, 사료 급이기와 급수기를 설치하였으며, 급수는 자유급수를 실시하였고, 기타 사양관리는 일반적인 관행법에 준하여 실시하였다.

혈액분석

공시동물의 채혈은 3시간 동시에 절식을 시킨 후 각 처리구에서 무작위로 선발된 8두의 목정맥으로부터 혈액을 채취하여 즉시 EDTA 처리된 vacutainer에

Table 1. Antioxidant capacities, total phenolic and flavonoids content of Bamboo extracts

| | DPPH ^a | HRSA ^b | ABST ^c | TPC ^d (mg) | Flavonoid (mg/g) |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Bamboo | 17.3±2.3 ^y | 12.3±1.5 ^z | 21.5±0.3 ^z | 171.25±11.4 ^y | 127.5±12.0 ^x |
| Positive control ¹⁾ | 79.5±0.3 ^x | 35.7±3.3 ^x | 34.08±3.5 ^x | - | - |

^aDPPH, DPPH radical scavenging activity; ^bHRSA, hydroxyl radical scavenging activity; ^cABST, ABST radical scavenging activity; ^dTPC, total phenolic acid. The positive controls of DPPH, HRSA and ABST were ascorbic acid, ascorbic acid and ascorbic acid, respectively. ^{x-z}The values are presented as the means±SD. *P*<0.01 represents a significant difference between the samples (n=4).

넣고 잘 흔든 다음 얼음을 채운 ice box에 넣어 실험실로 옮긴 후 혈구계수 분석에 이용하였다. 채취한 혈액은 vacutainer 넣어 채취해 온 그날 바로 0.1 mL을 채취하여 혈구계수기(VET abc, France, 2002)를 이용하여 혈구계수를 분석하였다. 분석한 항목은 백혈구(leukocytes, 10³/mm³), 적혈구(erythrocytes, 10⁶/mm³), 헤모글로빈(hemoglobin, g/dL), 헤마토크리트(hematocrit, %), 평균적혈구용적(MCV; mean corpuscular volume, μm³), 평균적혈구혈색소량(MCH; mean corpuscular hemoglobin, pg), 평균적혈구혈색소 농도(MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration, g/dL) 및 혈소판(platelet, 10³/mm³)을 분석하였다. 일반 tube에 보관한 시료를 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈청만 회수하여 혈액생화학 분석기(Express Plus, Bayer USA, 2002)를 이용하여 혈액화학치 분석에 이용하였다. 분석한 항목은 총 단백질(total protein, g/dL), 알부민(Albumin, g/dL), 아스파르테이트 아미노전이효소(AST; aspartate amino-transferase, U/L), 아미노전이효소(ALT; alanine amono-transferase, U/L), 젖산 탈수소효소(LDH; lactate dehydrogenase, U/L), 글루타민 전이효소(GTP; glutamyl transferase, U/L), 중성지방(triglycerides, mg/dL), 크레아티닌(creatinine, mg/dL)을 분석하였다.

면역글로부린 분석

혈액 내의 면역글로부린 함량을 측정하기 위해 항원·항체 반응을 이용하였다. 항체 측정 시 필요한 버퍼 중 stop solution을 제외한 모든 버퍼는 Bethyl사의 ELISA starter accessory package에 포함되어 있으며 그것들을 사용하였다. 희석된 capture antibody (1차 항체)를 96 well plate에 coating 및 washing 한 후, blacking solution을 넣어 항원·항체반응을 시켰다. 항원·항체반응이 완료된 시료에 HRP detection antibody를 넣은 후, substrate solution과 반응시켜 ELISA로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험의 표시된 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 mean±SD로 표시하였고, ANOVA를 이용하여 통계처리하고, Duncan test로 사후 검정하였다. 통계적 유의성은 *P*<0.05로 판정하였다.

결과 및 고찰

대나무 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량

대나무 80% 에탄올 추출물의 총 페놀 및 유효성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 추출물의 유효성분으로 총페놀 함량은 171 mg/g이었으며, 플라보노이드 함량은 127 mg/g으로 총 페놀함량에 대해 약 13.5% 높게 나타났다.

라디칼 소거능

대나무 80% 에탄올 추출물을 이용한 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability) 즉, DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 대나무 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 17.3%이었다. 대나무 추출물의 hydroxyl radical 소거능은 12.5%, ABTS+ 라디칼 소거활성은 17.5%로 높은 활성을 나타내었다. DPPH는 지질산화에 관여하는 유리라디칼의 비공유 결합을 소거하므로써 항산화활성을 나타내며(Anczewicz 등, 1998), ABTS 라디칼 소거활성은 양이온 라디칼의 소거에 의한 항산화 활성으로 DPPH 라디칼 소거활성과 상관성이 높고 유효 물질이 페놀 화합물과 관련된다고 보고되어 있으며(Choi 등, 2003), hydroxyl radical은 활성산소 중에서 화학적으로 반응성이 가장 크며 생체 내 산화 작용의 원인으로 DNA 손상이나 돌연변이 유발 물질로 알려져 있다(Bloknina 등, 2003; Hochstein와 Atallah, 1988). Wang 등(1999)

에 의하면 전자공여능은 phenolic acids, 플라보노이드 성 및 기타 페놀성 물질에 의한 항산화작용의 지표라고 하였으며, 이러한 물질의 환원력이 클수록 DPPH, ABST 라디칼 소거활성이 크다고 하였다. 식물체에 널리 분포하는 polyphenol 성분은 항산화 및 항균작용을 비롯한 다양한 생리활성을 나타내며(Osawa, 1994), polyphenol성 물질의 함량이 높을수록 항산화력이 높아진다(Holasova 등, 2002). 더욱 ABST 라디칼 소거능은 DPPH 라디칼 소거활성과 유의적인 상관성을 보이며 그 유효 물질이 페놀 화합물에서 연유된다고 보고(Choi 등, 2003)되었으며, 천연약용물질의 페놀 및 플라보노이드 함량은 DPPH, hydroxyl radical 및 ABST 라디칼 소거활성능에 비례하여 높게 나타난다(Choi 등, 2003; Holasova 등, 2002). Zhang의 연구 결과에 의하면 대나무 추출물은 높은 polyphenol 성분을 포함한 것으로 보고하였으며(Zhang, 2002), 자유 라디칼의 소거활성도 높게 나타났다(Park 등, 2007). 한편 국내의 식용 및 약용 버섯의 생리활성을 비교한 연구에서 약용버섯은 식용버섯에 비해 항산화 및 대장암 발생 억제에 더 효과적이었으며, 이러한 이유가 약용 버섯류 중에 총페놀 및 플라보노이드 함량이 더 많았기 때문이라고 보고되어 있다(Choi 등, 2003). 본 연구에서 대나무 분말 에탄올 추출물의 항산화 효과를 탐색하기 위해 DPPH, hydroxyl radical와 ABST 라디칼 소거활성을 측정된 결과는 Zhang 등이 발표한 연구 결과와 유사하였으며, 대나무 추출물은 강한 항산화 효과를 나타내었다. 따라서 본 연구 결과에서 대나무 추출물의 이들 라디칼에 대한 소거활성이 두드러지게 나타난 것은 시료 중 유효성분의 존재로 추정할 수 있으며, 더욱이 시료의 총페놀 함량과 플라보노이드 함량이 높은 수준으로 나타나는 것으로 보아 시료의 항산화 활성은 페놀 및 플라보노이드 화합물에 의존적일 것으로 추정된다.

MTT assay 결과

다음으로 대나무 추출물에 대한 항암활성을 알아보기 위하여 CHO 세포에 대나무 추출물을 처리하여 MTT assay로 암 세포 성장억제 정도를 측정된 결과, Fig. 1과 같이 나타났다. MTT assay는 살아있는 세포가 미토콘드리아의 탈수소효소를 이용하여 황색의 MTT를 환원시켜 분광광도법으로 측정이 가능한 자색의 formazan 결정을 형성하는 특성을 이용하는 방법이다. 암세포주인 CHO 세포에 대나무 추출물 농도

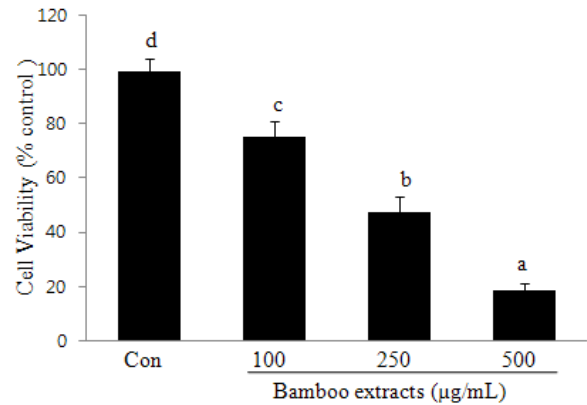
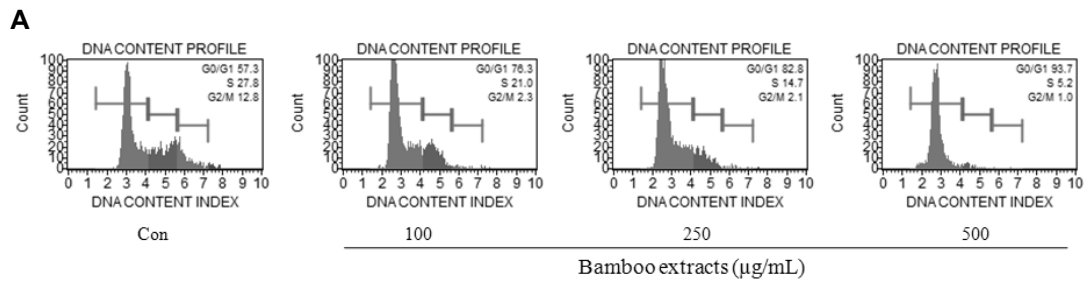


Fig. 1. Effect of Bamboo extracts on cell viability in CHO cells. CHO cells were incubated with Bamboo extracts (0~500 µg/mL) for 24 hr. Vehicle treated was control. Cell viability after treatment with Bamboo was determined by the MTT assay. The values are presented as the means±SD. The data shown are representative of at least three independent experiments. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

100 µg/mL으로 처리시 무처리 군에 비하여 유의적으로 암세포 성장 억제를 보였으며, 250 µg/mL 농도에서 50% 암세포 성장억제를 보였다. 더욱 대나무 추출물의 항암효과는 500 µg/mL 처리시 80% 이상의 세포 증식 억제력을 나타내었다(Fig. 1). 본 실험에 사용된 대나무는 CHO 세포에서 추출물 처리 농도의 존적으로 세포 성장을 억제시켰다. 이상의 결과를 종합해 보면, 대나무 추출물은 항산화 효과 및 항암활성을 강하게 나타내므로 기능성을 함유한 물질로서의 생체 생리 활성을 증가 시킬 것으로 사료된다.

CHO 세포의 G1 arrest 유도

대나무 추출물이 CHO의 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대나무 추출물을 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL 농도로 세포에 처리하고 24시간 배양 후 flow cytometry를 이용하여 세포주기 변화를 측정하였다. Fig. 2A의 histogram 결과와 같이 대나무 추출물 처리 농도가 높아질수록 G1/G0기의 세포분포가 점차 증가한다. 반면, S기 및 G2/M기의 세포는 대나무 추출물 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 또한 Fig. 2B에서 나타낸 바와 같이 각 주기별 실제 세포분포수를 확인한 결과, DMSO 대조군에서는 57.3%였던 G1기 세포분포는 대나무 추출물 처리 농도 의존적으로 증가하여 최고 농도인 500 µg/mL에서는 93%의 CHO 세포가 G1기에 정체되어 있다. 상대적으로 G1기 이후 단계인 S기 및 G2/M기의 세포는



B

| Bamboo extracts (µg/mL) | % of cell | | |
|-------------------------|-----------|------|------|
| | G0/G1 | S | G2/M |
| 0 | 57.3 | 27.8 | 12.8 |
| 100 | 76.3 | 21.0 | 2.3 |
| 250 | 82.8 | 14.7 | 2.1 |
| 500 | 93.7 | 5.2 | 1.0 |

Fig. 2. G0/1 arrest of cell cycle in Bamboo-treated CHO cells. (A) Intracellular DNA contents with PI staining and cell cycle arrest analysis were observed by flow cytometry. CHO cells were treated with 0~500 µg/mL of Bamboo extracts for 24 hr. Vehicle treated was control. The cells were harvested, washed, and then fixed with ice-cold 70% (v/v) ethanol. After that, propidium iodide (PI) (1 mg/ml) was stained at 4°C for 30 min and analyzed by flow cytometry. (B) The percentage of the cell cycle distribution data in histograms.

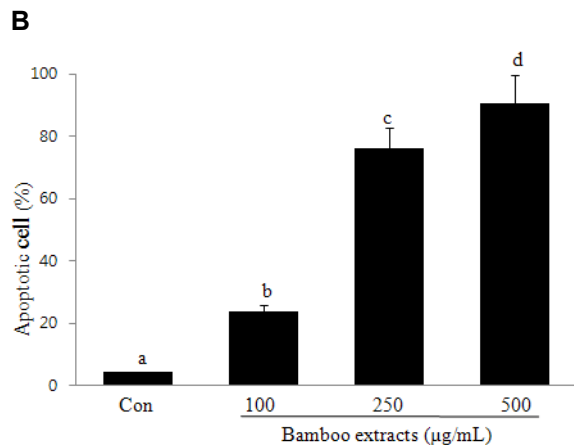
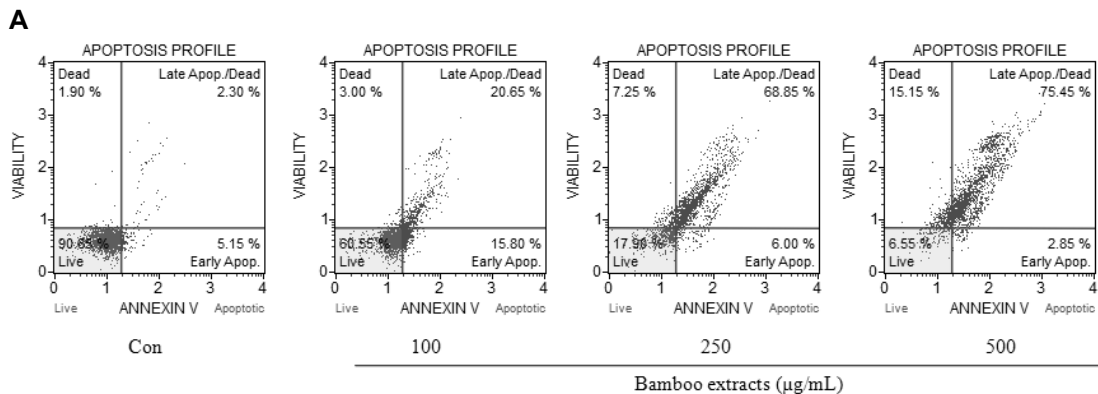


Fig. 3. Effect of Bamboo on apoptosis in CHO cells. (A) Annexin-V staining assay detected by flow cytometry. CHO cells were treated with Bamboo extracts (0~500 µg/mL) for 24 hr. Vehicle treated was control. (B) The percentage of apoptotic cell data in histograms. Data are presented as mean±SD. A representative study is shown and three additional experiments yielded similar results. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

각각 27.8%에서 5.2%로, 12.8%에서 1.0%로 감소하였다(Fig. 2). 따라서 CHO 세포에서 대나무 추출물의 처리는 강력하게 G1 arrest를 유도한다.

CHO의 세포 사멸 분석

세포사멸을 유도하는 것을 Annexin V-apoptosis detection kit를 이용하여 정량화 할 수 있다. 본 연구에서는 대나무 추출물을 100~500 µg/mL의 농도로 24 시간 처리한 뒤, 세포막 외부로 노출되는 phosphatidylserine (PS)과 세포막의 파괴로 인해 노출되는 핵을 각각 Annexin-V를 염색하여 자동세포 분석기로 측정하였다. 대나무 추출물 처리에 의하여 유발되는 apoptosis의 정도를 정량화하기 위하여 annexin V에 positive한 염색 반응을 보이는 세포의 정도를 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. Fig. 3A에서 알 수 있듯이 대나무 추출물 처리 농도 증가에 따라, annexin V에 positive하게 나타나는 세포의 수가 점점 증가하였다. 따라서 대나무 추출물 처리는 농도 및 처리 시간 의존적으로 세포사멸의 정도를 증가시킨다. 특히, 무처리군에 비교하여 대나무 추출물 500 µg/mL 농도로 24시간 처리시, 세포사의 비율이 4.2%에서 90.5%로 크게 증가하는 것을 확인함으로써 대나무 추출물이 CHO 세포에서 세포사멸을 강하게 유도하는 것을 알 수 있다(Fig. 3B). Fig. 3B는 세포사멸이 유도된 세포를 백분율로 나타내었다. 이상의 MTT 결과에 의하여 대나무 추출물은 난소암세포의 증식을 강하게 억제시키며, flow cytometry의 세포 주기 분석과 세포사 세포율 분석에 의하여 암세포의 세포주기 G1기 arrest를 유도하여 세포사를 강하게 유발시키는

것으로 생각된다. 본 연구는 세포주기와 관련하여 대나무 추출물의 암 세포에 대한 세포사멸기작을 확인하였으며 이는 대나무 추출물이 보유하고 있는 항산화력과 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

돼지 혈액의 혈구계수

다음으로 대나무 분말이 함유된 배합사료 급여시 대나무 분말이 돼지의 생리활성에 미치는 영향을 알아보았다. 비육돈에 대나무분말을 1.0%, 2.0% 및 3.0% 수준으로 첨가하였을 때 분말 첨가에 의한 혈액의 혈구계수에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. 대나무 분말 첨가 수준에 따른 반응을 검토한 결과 사료섭취량은 대조군에 비해 대나무분말 첨가구들에서 유의적으로 높았으며 대나무분말 첨가수준이 높을수록 높아지는 경향을 나타내었으나 첨가구들간에 유의한 차이는 없었다. 대나무분말을 처리는 무처리군과 비교하여 백혈구 수, 적혈구 수 및 헤마토크리트 함량에서 비슷한 수준을 보였다(Table 2). 또한 대나무분말 급여는 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH) 및 평균적혈구혈색소 농도(MCHC) 함량에는 무처리와 처리군간에 유의적인 영향을 주지 않았다(Table 2). 하지만 헤모글로빈 함량의 분석 결과에서 대나무분말 2~3% 첨가된 그룹에서 대조군인 무처리 그룹에 비해 증가된 수치를 보였다. 그리고 대나무분말 첨가구들이 대조군에 비해 혈소판 함량을 유의적으로 증가시켰다. 본 연구의 결과 대나무 분말 처리는 혈구계수 중 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈의 차이는 없지만, 헤모글로빈, 혈소판 함량을 높이는 것으로 나타났다. Song 등(2011)은 술잎을 이용

Table 2. Effects of Bamboo powder on blood corpuscle in fattening pigs

| Items | Treatments ¹⁾ | | | |
|--------------------------------------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Control | T1 | T2 | T3 |
| Blood corpuscle | | | | |
| Leukocytes (10 ³ /mm ³) | 14.83±1.84 | 16.57±1.20 | 15.72±1.50 | 14.91±1.25 |
| Erythrocytes (10 ⁶ /mm ³) | 6.73±0.56 | 7.19±0.23 | 7.09±0.27 | 7.31±0.54 |
| Hemoglobin (g/dL) | 12.08±0.62 | 12.55±0.23 | 13.52±0.23* | 13.90±0.36* |
| Hematocrit (%) | 39.18±3.01 | 41.53±0.72 | 41.82±0.70 | 43.90±1.14 |
| MCV (µm ³) | 59.05±0.72 | 57.00±1.04 | 58.20±0.77 | 57.70±0.75 |
| MCH (pg) | 18.38±0.17 | 17.78±0.31 | 18.38±0.30 | 18.13±0.34 |
| MCHC (g/dL) | 31.13±0.14 | 31.18±0.19 | 31.57±0.15 | 31.40±0.20 |
| Platelet (10 ³ /mm ³) | 153.3±80.7 | 290.8±23.5* | 295.5±26.9* | 310.0±21.5* |

The values are expressed as the means±SD. **P*<0.05 compared with the control group. ¹⁾Bamboo powder was added 0.0% (control), 1.0% (T1), 2.0% (T2), and 3.0% (T3).

한 발효사료를 돼지에 급여 시켰을 때 혈액의 혈소판 증가와 동반하여 헤모글로빈 함량의 증가에 의한 면역력 증가를 보고한바 있으며, 본 연구의 결과 대나무 분말 처리에 의한 혈액의 헤모글로빈뿐만 아니라 혈소판 함량의 증가는 돼지의 면역력에 관여 하는 것으로 추측된다.

돼지의 혈액 생화학

대나무분말을 1.0%, 2.0% 및 3.0% 수준으로 첨가하였을 때 혈액 생화학 조성에 미치는 영향은 Table 3 과 같다. 대나무분말 첨가구와 무첨가구와 비교하여 혈액 생화학 조성 중의 총단백질, 알부민의 함량에는 유의적인 영향을 주지 않았다. 혈중 AST, ALT, LDH, GTP, 중성지방, 크레아티닌의 함량도 무첨가구와 차이가 없었으며, 대나무분말의 수준별 첨가에서도 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

돼지 혈중의 면역글로부린 함량

비육돈에 있어서 대나무분말을 1.0%, 2.0% 및 3.0% 수준으로 첨가하였을 혈액내 면역글로부린 함량에 미치는 영향은 Table 4에 나타내었다. 대나무분말 1.0%, 2.0% 및 3.0% 첨가는 면역글로부린 중 IgG의 함량을 대조구에 비교하여 유의적으로 증가시켰다 (Table 4). 혈액 내 IgG의 농도는 무처리 대조구의 7.59 mg/mL와 비교하여 0.1%, 0.2%, 0.3% 처리 그룹에서 각각 10.23, 12.02 그리고 11.55 mg/mL로 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 대나무 추출물 2% 처리구가 1% 처리구에 비해 IgG 농도에서 유의적으로 높은 수준을 나타내었다. IgA의 수치 또한 대나무분말 첨가 그룹에서 대조구에 비하여 높은 수치를 보였다. 또한 대나무분말 1.0%, 2.0% 및 3.0% 급여는 대조구에 비해 혈액 중의 코티졸 함량을 유의적으로 감소시켰다 (Table 4). 본 연구 결과에서 대나무 분말의 급여가 immunoglobulin의 함량을 높이는 원인은 정확하게 알 수 없으나 대나무 분말의 성분 중에는 돼지 초기 면역 반응을 증가시킬 수 있는 물질이 포함되어 있

Table 3. Effects of Bamboo powder on chemical composition of blood plasma in fattening pigs

| Items | Treatments ¹⁾ | | | |
|-----------------------|--------------------------|-------------|------------|------------|
| | Control | T1 | T2 | T3 |
| Chemical composition | | | | |
| Total protein (g/dL) | 6.50±0.09 | 6.48±0.20 | 6.18±0.10 | 6.30±0.09 |
| Albumin (g/dL) | 3.13±0.17 | 3.13±0.09 | 3.05±0.03 | 3.08±0.03 |
| AST (U/L) | 30.00±2.12 | 32.50±12.69 | 33.83±3.18 | 35.25±3.04 |
| ALT (U/L) | 58.00±2.74 | 60.25±6.12 | 58.67±4.26 | 59.25±3.59 |
| LDH (U/L) | 788.5±34.5 | 723.5±21.8 | 776.5±44.3 | 759.8±53.4 |
| GTP (U/L) | 34.00±4.18 | 48.50±3.07 | 43.17±3.67 | 43.50±4.73 |
| Triglycerides (mg/dL) | 32.5±2.36 | 31.00±4.64 | 24.50±4.38 | 29.75±4.39 |
| Creatinine (mg/dL) | 1.08±0.13 | 1.05±0.06 | 0.90±0.05 | 0.90±0.04 |

The values are expressed as the means±SD. * $P < 0.05$ compared with the control group. ¹⁾Bamboo powder was added 0.0% (control), 1.0% (T1), 2.0% (T2), and 3.0% (T3).

Table 4. Effects of Bamboo powder on of immunoglobulin concentration in fattening pigs

| Items | Treatments ¹⁾ | | | |
|------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Control | T1 | T2 | T3 |
| Immunoglobulin (mg/mL) | | | | |
| IgA | 1.77±0.26 ^a | 2.90±0.17 ^b | 2.82±0.14 ^b | 2.79±0.12 ^b |
| IgG | 7.59±0.58 ^a | 10.23±0.98 ^b | 12.02±0.45 ^c | 11.55±0.78 ^{bc} |
| Cortisol (µg/dL) | 5.79±1.07 ^c | 3.92±0.48 ^b | 3.82±0.69 ^b | 2.99±0.28 ^a |

¹⁾Bamboo powder was added 0.0% (control), 1.0% (T1), 2.0% (T2), and 3.0% (T3). The values are expressed as the means±SD. ^{a,b,c}Values in the same row with different superscripts differ at $P < 0.05$.

Table 5. Effects of Bamboo powder on serum cytokine concentration in fattening pigs

| Items | Treatments ¹⁾ | | | |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Control | T1 | T2 | T3 |
| Cytokine (pg/mL) | | | | |
| Interferon- γ | 76.90 \pm 7.61 ^d | 499.5 \pm 103.5 ^c | 1028.7 \pm 146.3 ^b | 1161.8 \pm 148.8 ^a |
| Interleukin-2 | ND ²⁾ | ND | ND | ND |
| Interleukin-6 | ND | ND | ND | ND |
| TNF- α | 2126 \pm 418 | 2555 \pm 445 | 2612 \pm 196 | 2648 \pm 275 |

¹⁾Baboo powder was added 0.0% (control), 1.0% (T1), 2.0% (T2), and 3.0% (T3). ²⁾Not detected. The values are expressed as the means \pm SD. ^{a,b,c}Values in the same row with different superscripts differ at $P < 0.05$.

어, B 임파구 자극 및 활성을 유도 하는 것으로 사료 된다. 천연생약제재인 지황, 당귀, 작약, 감초, 오미자, 천궁등을 이용한 연구에서 이들 천연물이 돼지 면역력을 증강시킨다고 보고하였으며(Lee와 Paik, 2007), Xie (1996)의 연구 결과에 의하면 천연 생약제제는 사료섭취, 소화효소 분비, 면역증강에 영향을 주며 경우에 따라서는 항콕시딕, 항살충작용, 항바이러스 작용 등을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서 대나무 분말은 유효성분으로 높은 페놀과 플라보노이드 성분을 포함하고 있었으며, 이들의 자유라디칼 소거 활성능 또한 높게 나타났다. 따라서, 대나무 분말의 높은 항산화력은 돼지 면역력 증강 활성에 역할을 하는 것으로 사료 된다. 한편, 락등의 연구 결과는 천연물 추출물 지황을 이용한 연구에서 mouse의 면역인식세포 증식을 억제하고 사람의 임파구 유약화 반응 촉진작용을 가지며 생지황과 숙지황 추출물을 첨가한 결과 immunoglobulin들을 상승시킨다(락, 1992)고 보고하였다. 따라서 본 연구의 결과, 대나무분말 첨가는 혈액 중의 면역글로부린 함량의 증가와 코티졸 함량의 감소를 통하여 비육돈의 면역력을 높이는 것으로 사료된다.

돼지 열중의 사이토카인 함량

대나무분말을 1.0%, 2.0% 및 3.0% 수준으로 첨가하였을 때 사이토카인 함량에 미치는 영향은 Table 5와 같다. Interferon- γ 의 함량을 측정한 결과 대나무분말 1.0%, 2.0% 및 3.0% 급여는 대조구의 76.90 pg/mL에 비해 각각 499.5, 1028.7, 1161.8 pg/mL의 농도로 증가하였으며, 이는 대나무 분말 처리 농도 의존적으로 Interferon- γ 의 함량이 강하게 증가함 알 수 있다(Table 5). TNF- α 의 함량은 interferon- γ 의 결과와 마찬가지로 대조구와 비교하였을 때 대나무 분말이 첨가

된 사료를 급여시킨 실험구에서 크게 증가 하는 양상을 나타내었다(Table 5). 인터루킨-2 및 인터루킨-6은 무처리 대조구를 포함한 모든구에서 검출되지 않았다. 따라서 본 연구의 결과, 대나무분말 첨가는 혈액 중의 인터페론 함량을 증가시키는 것으로 보아 비육돈의 면역력을 높이는 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구는 대나무 분말의 항산화 활성이 비육돈에서 면역조절 효과에 미치는 영향을 구명하기 위해 실시하였으며, 이를 위해 대나무 분말 추출물의 항산화능을 검정하기 위하여, 총페놀 함량, 플라보노이드 함량 및 DHHP, ABST, hydroxyl radical 등의 소거활성능을 알아보았다. 대나무 추출물의 항산화능은 높게 나타났으며, DPPH와 ABTS, HRSA 라디칼 소거능은 12~21%였으며, 추출물의 유효성분으로 총페놀 함량은 171 mg/g이었으며, 플라보노이드 함량은 127. mg/g으로 나타났다. 다음으로 대나무 분말이 함유된 배합사료 급여시 돼지의 면역력에 미치는 영향을 알아보았다. 처리구에는 일반사료를 급여하였고, 시험구는 일반사료에 대나무분말을 1.0%, 2.0% 및 3.0%를 첨가하여 급여하였다. 대나무분말 첨가수준에 따라 혈액의 혈구계수 중 백혈구, 적혈구, 헤마토크리트 함량에서 유의적인 수준의 차이를 나타내지 않았다. 하지만 헤모글로빈 함량이 무처리 대조구에 비교하여 증가하였으며 특히 2~3%의 처리구에서 헤모글로빈 함량은 높게 나타났다. 혈액 내 총단백질, 혈중알부민의 농도를 분석한 결과 처리구와 무처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. AST, ALT 함량은 대나무 분말 처리군에서 무처리군보다 약간 높게 나타나지만 정상적인 범위내에서의 변화를 보였

다. immunoglobulin에서 IgA와 IgG 농도는 무처리구에 비교하여 대나무 분말 처리구에서 높게 나타나고, IgA는 처리구 간의 차이가 나타나지 않았지만 IgG 농도에서는 대나무 추출물 2%, 3% 처리구가 1% 처리구에 비해 높은 수준을 나타냈다. TNF- α 의 경우 무첨가구와 첨가구 사이의 유의적인 차이가 없었지만, 대나무 분말 첨가구에서 interferon- γ 의 함량은 모든 첨가구에서 무처리 군보다 유의적으로 높게 나타났다. 특히 2%, 3% 처리구가 1%의 처리구 보다도 높은 interferon- γ 의 함량을 나타내었다. 이는 대나무의 페놀, 또는 플라보노이드 성분에 기초한 높은 항산화력에 의하거나, 또는 대나무에 포함된 돼지 초기 면역 반응을 활성화시킬 수 있는 물질에 의한 면역활성 증강에 따른 것으로 사료된다. 결론적으로 대나무 분말의 높은 항산화력은 돼지 면역력 향상에 기여하였으며, 특히 2~3% 대나무 분말 첨가 사료는 돼지 생리 활성을 크게 증강시키는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 IPET 연구과제(112001032SB030)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업(2009-0093813)으로 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

락화생. 1992. 면역과 한방. 열린책들. 45: 235-242.
 Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Brée F, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A, Le Ridant A. 1998. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med* 25: 113-120.
 Bloknina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot* 91: 179-194.
 Bosoi CR, Rose CF. 2013. Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 28: 175-178.
 Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol* 28: 25-30.
 Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutri* 32: 723-727.

Dausch, JG, Nixon, DW. 1990. Garlic: A review of its relationship to malignant disease. *Preventive Medicine* 19: 346-361.
 Goo BH. 1997. Dong Ui Bo Gam. Korea Dictionary Research Publishing. pp. 954-960
 Hochstein P, Atallah AS. 1988. The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutation Res* 202: 363-375.
 Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S. 2002. Buckwheat the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res Int* 35: 207-211.
 Huang MT, Ho CT, Lee CY. 1992. Phenolic compounds in food. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*. Maple Press, New York, NY, USA 99: 2-7.
 Hwang JY, Han JS. 2007. Inhibitory effects of *Sasa borealis* leaves extracts on carbohydrate digestive enzymes and postprandial hyperglycemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 989-994.
 Jang HD, Lee JH, Hong SM, Jung JH, Kim IH. 2010. Effects of Supplemental Medicinal Plants (*Artemisia*, *Acanthopanax* and *Garlic*) on Productive Performance of Sows and on Growth and Carcass Traits in Finishing Pigs. *Journal of Animal Science and Technology* 52: 103-110.
 Khan HY, Zubair H, Ullah MF, Ahmad A, Hadi SM. 2012. A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. *Curr Drug Targets* 13: 1738-1749.
 Kim EY, Jung EY, Lim HS, Heo YR. 2007. The effects of *Sasa borealis* leaves extract on plasma adiponectin, resistin, C-reactive protein and homocysteine levels in high diet-induced obese C57/BL6J mice. *Korean J Nutr* 40: 303-311.
 Kweon MH, Hwang HJ, Sung HC. 2001. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *J Agric Food Chem* 49: 4646-4655.
 Lee SJ, Sung NJ, Jeong HG, Shin JH, Chung YC, Seo JK. 2008. Antioxidant activities of methanol extracts from *Prunella vulgaris*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1535-1541.
 Lee SM, Son ES, Oh SS, Han DS. 2001. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. *Korean J Dietary Culture* 16: 504-514.
 Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J Medicinal Crop Sci* 13: 93-100.
 Lee SW, Paik IK. 2007. Effects of Herb Mix Supplementation on the Performance of Weanling Pigs. *J Anim Sci & Technol* 49: 321-328.
 Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta* 1472: 142-152.
 Mark DN. 2000. Herbs source of nutrition versus herbs as a

- source of drugs : A matter of claim, biology and regulations. In: *Biotechnology in the feed industry* (Lyons T. P. and K. A. Jacques eds). Nottingham University Press. pp. 295-300.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91: 571-577.
- Newman, KE, Devegowda G. 1998. Merging modern agriculture with the herbal revolution : possibilities for livestock production. What we do and do not know. In: *Biotechnology in the feed industry* (Lyons T. P. and K. A. Jacques eds). Nottingham University Press. pp. 300-306.
- Osawa T. 1994. Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. In *Postharvest Biochemistry of Plant Food Material in the Tropics*. Japan Scientific Societies Press. pp. 241-251.
- Park HS, Lim JH, Kim HJ, Choi HJ, Lee IS. 2007. Antioxidant Flavone Glycosides from the Leaves of *Sasa borealis*. *Arch Pharm Res* 30: 161-166.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- Singleton VL, Rossi JR. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic* 16: 144-158.
- Song YM, Chu GM, Ha JH, Lee HJ, Kim SC, Kim HY. 2011. Effects of Fermented Diet Using Probiotics from Pine Needle Microbes on Growth Performance, Blood Characteristics, Carcass Traits and Economy of Pigs. *Journal of Agriculture & Life Science* 45: 93-101.
- Steinmetz KA, Potter JD. 1991. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 2: 427-442.
- Xie IO, Niu SQ. 1996. *Comprehensive book of natural resources and Chinese herb feed additives*. Xueyuan Press. Beijing. P. R. C.
- Wang M, Shao Y, Li J, Zhu N, Rangarajan M, LaVoie EJ, Ho CT. 1999. Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). *J Nat Prod* 62: 454-456.
- Zhang Y. 2002. Natural functional extract of bamboo leaves-bamboo leaf anthoxanthin. *China Food Additives* 3: 54-58.